



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**POUŽITÍ EXTRAKCE TUHOU FÁZÍ PRO FRAKCIONACI
LIPIDŮ V SÝROVÉ MATRICI**

THE USE OF SOLID PHASE EXTRACTION FOR FRACTIONATION OF LIPIDS IN CHEESE MATRIX

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristýna Stavínková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK1034/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Kristýna Stavínohová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Martina Mahdalová	

Název bakalářské práce:

Použití extrakce tuhou fází pro frakcionaci lipidů v sýrové matici

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - mléčný tuk – charakteristika, složení, vlastnosti; lipidy v sýrech
 - mastné kyseliny v sýrech
 - stanovení mastných kyselin a lipidů v sýrech
 - extrakce tuhou fází (SPE) - princip, popis, instrumentace
2. Ověřte možnost využití SPE pro frakcionaci lipidů v sýrech (postup, optimální podmínky)
3. Diskutujte výhody a nevýhody zvolené a ověřené metody

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Kristýna Stavínohová
Student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tématem této práce je metoda extrakce tuhou fází jako prostředek k získání frakce volných mastných kyselin ze sýrové matrice pro následné stanovení pomocí plynové chromatografie s FID detekcí.

Teoretická část zpracovává informace ohledně složení mléčného tuku a souvisejících procesů, které vedou ke vzniku senzory aktivních komponent, mezi něž se volné mastné kyseliny řadí. Hlavním tématem literární rešerše jsou možnosti stanovení mastných kyselin v sýrech se zaměřením na dosavadní poznatky o použití extrakce tuhou fází k tomuto účelu.

Experimentální část se zabývá nalezením vhodných parametrů a podmínek pro použití extrakce tuhou fází k frakcionaci lipidů na kolonách se zakotvenou aminopropylou fází. Pro separaci lipidů byly použity kolony Agilent SampliQ Amino a pomocí vhodných směsí rozpouštědel byly eluovány frakce lipidů. Čistota a složení získaných frakcí byly ověřovány kombinací plynové a tenkovrstvé chromatografické techniky. Pro převedení mastných kyselin na methylestery ke stanovení plynovou chromatografií byly použity postupy podle normy ČSN EN ISO 12966-2. Součástí vyhodnocení jsou, mimo diskusi o vhodných experimentálních podmínkách, závěry ohledně optimálních množství vzorku a elučních činidel. Výsledky této práce jsou vhodným podkladem pro navazující optimalizační experimenty a následné zařazení validované metody do procesu stanovení volných mastných kyselin.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with Solid Phase Extraction, as a method for isolation of free fatty acids from cheese matrix to be subsequently determined using gas chromatography with FID detection.

The theoretical part provides information about milk fat composition and related reactions being a source of flavour compounds, free fatty acids including. The main objective of the theoretical research is to summarize alternatives to determining fatty acids in cheese, focusing on current advancement and use of Solid Phase Extraction for this purpose.

The practical part discovers proper technique and conditions for fractionation of lipids by Solid Phase Extraction, using aminopropyl bonded phase columns. Agilent SampliQ Amino columns were utilized to separate lipid mixture, and different lipid classes were eluted using suitable organic solvents. Composition and purity of lipid extracts were verified combining thin layer chromatography and gas chromatography. Before being determined by gas chromatography, free fatty acids were converted into methylesters, based on ČSN EN ISO 12966-2. Besides discussing proper experimental conditions, the assessment also comes with solving optimal volumes of the sample and eluting solvents to apply. The results of this thesis are considered to be a useful base for subsequent experimental optimization and following integration of validated method into process of determining free fatty acids.

KLÍČOVÁ SLOVA

sýry, GC, MK, SPE

KEY WORDS

cheese, GC, FA, SPE

STAVINHOVÁ, K. *Použití extrakce tuhou fází pro frakcionaci lipidů v sýrové matrici*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité literární zdroje jsem odcitovala správně a úplně. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využívána ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala paní Ing. Evě Vítové, Ph.D. a dalším pedagogům Fakulty chemické za cenné rady, ochotu a za čas, věnovaný konzultacím mé bakalářské práce.

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Mléčný tuk	8
2.1.1	Složení a vlastnosti mléčného tuku	8
2.1.1.1	Obsah mastných kyselin v mléčném tuku	9
2.2	Lipidy (a další složky mléka) jako zdroj senzorických vlastností sýrů	11
2.2.1	Termické působení	11
2.2.2	Autooxidace lipidů	12
2.2.3	Fermentace bakteriemi mléčného kvašení	12
2.2.3.1	Glykolýza	12
2.2.3.2	Proteolýza	12
2.2.3.3	Lipolýza	13
2.3	Možnosti stanovení mastných kyselin v sýru	13
2.3.1	Stanovení celkového obsahu mastných kyselin	13
2.3.2	Jednoduché metody kvantifikace volných mastných kyselin	15
2.3.3	Metody izolace volných mastných kyselin	15
2.3.3.1	Chromatografie na tenké vrstvě	15
2.3.3.2	Mikroextrakce tuhou fází	16
2.3.3.3	Superkritická fluidní extrakce	16
2.3.3.4	Extrakce tvorbou tetramethylamoniových mýdel	16
2.3.4	Extrakce tuhou fází	17
2.3.4.1	Výhody a nevýhody	17
2.3.4.2	Instrumentace a rozvoj techniky	17
2.3.4.3	Princip separace	18
2.3.4.4	Metodologie	19
2.3.4.5	Použití SPE pro frakcionaci lipidů	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Laboratorní vybavení a chemikálie	21
3.1.1	Plyny	21
3.1.2	Přístroje	21
3.1.3	Pracovní pomůcky	21
3.1.4	Chemikálie	21
3.2	Analyzované vzorky	22
3.3	Použité metody	22
3.3.1	Extrakce lipidů ze vzorku dle normy ČSN EN ISO 1735	22
3.3.2	Frakcionace lipidů metodou SPE	23
3.3.3	Frakcionace lipidů metodou TLC	25
3.3.4	Esterifikace mastných kyselin	25
3.3.4.1	Esterifikace v bazickém prostředí	25
3.3.4.2	Esterifikace za podmínek kyselé katalýzy	26
3.3.4.3	Esterifikace za katalýzy bortrifluoridem	27

3.3.5	Podmínky metody pro stanovení methylesterů mastných kyselin	27
3.3.6	Identifikace a kvantifikace mastných kyselin	28
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	29
4.1	Optimalizace podmínek SPE	29
4.1.1	Optimalizace objemů rozpouštědel	29
4.1.2	Eluce frakce neutrálních lipidů	30
4.1.3	Eluce frakce volných mastných kyselin	33
4.2	Sorpční kapacita kolonky	34
4.3	Kvantifikace metodou rozdílných esterifikačních podmínek	35
4.4	Experimentální podmínky, trvanlivost a uchovávání extraktů.....	37
5	ZÁVĚR	40
6	LITERATURA.....	41

1 ÚVOD

Sýry a mléčné výrobky obecně tvoří podstatnou součást lidské stravy. Slouží jako zdroj významných nutričních složek, jako jsou vápník, mléčné proteiny a v neposlední řadě mléčné tuky.

Obsah a skladba lipidů v potravinách hrají důležitou roli při posuzování jejich senzorických vlastností. Zásadní vliv na senzorické vlastnosti sýrů mají obsažené volné mastné kyseliny, přestože jsou v sýrové matrici přítomny pouze ve velmi nízké koncentraci. Množství volných mastných kyselin je možno porovnávat v závislosti na druhu, způsobu výroby, a především zralosti sýru, která má díky lipolytickým aktivitám enzymů s obsahem nevázaných mastných kyselin přímou souvislost. Stanovení volných mastných kyselin obsažených v sýrech může pomoci tyto souvislosti odhalit a aplikovat v rámci výrobních postupů.

Cílem této práce je optimalizovat metodu extrakce tuhou fází, jakožto prostředek k oddělení frakce volných mastných kyselin z lipidického extraktu sýru. Tato metoda ve spojení s plynovou chromatografií s FID detektorem by následně měla být použitelná pro identifikaci a kvantifikaci volných mastných kyselin v různých typech sýrů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mléčný tuk

2.1.1 Složení a vlastnosti mléčného tuku

Mléčný tuk, který se vyskytuje v mléce a všech mléčných výrobcích, je hlavním nositelem energetické hodnoty těchto produktů. Význačnou vlastností mléčného tuku je jeho vysoká stravitelnost [1] a velmi komplexní složení. Mléčné lipidy jsou důležitým zdrojem esenciálních mastných kyselin (např. kyselina linolová $C_{18:2}$) a vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K). Mimo to jsou mléčné tuky podstatným zdrojem chuti a technologických vlastností mléčných produktů. Na druhou stranu, mléčné tuky slouží také jako prekurzory sloučenin, které výrazně negativně ovlivňují senzorické vlastnosti mléčných výrobků (hydrolytické a autooxidační pochody). [2] (kap. 2.2)

Kravné mléko v syrovém stavu obsahuje zhruba 87 % vody, 4,6 % laktosu, 3,4 % proteinů (hlavně casein), 4,2 % tuku, 0,8 % minerálů a 0,1 % vitaminů. [3] Množství i složení obsaženého tuku je velice různorodé a podílí se na něm mnoho faktorů, jako například plemeno, stáří a zdravotní stav dojníc, typ krmiva, podnebí, stádium laktace nebo interval mezi dojením. Primární funkcí obsažených tuků je zajištění přísunu energie pro mláďata, a proto obsah tuků v mléce odráží energetické požadavky jednotlivých druhů – například savci v chladných oblastech nebo zvířata chovaná pro potřeby armád produkují ve svém mléce velmi vysoké hladiny tuku. [2]

V mléčné plazmě je tuk dispergován v podobě tzv. tukových kuliček, které vytvářejí velký povrch, snadno přístupný lipolytickým enzymům. [4] Velikost těchto kuliček se může pohybovat v rozmezí 1 – 10 μm , přičemž největší část objemu je tvořena kuličkami o průměrné velikosti 3 – 4 μm . Nejde však o pouhou emulzi tuku v mléce. Proti shlukování kuliček působí lipoproteinová membrána, kterou jsou tukové kuličky obaleny v průběhu sekrece mléčnou žlázou. [5] Membránové struktury mohou tvořit 2 – 6 % hmoty tukové kuličky.

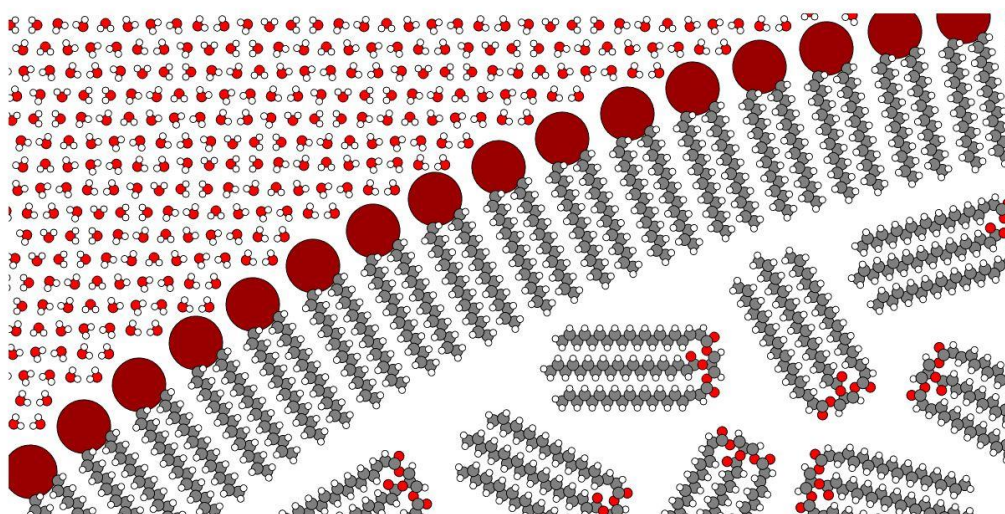
Lipidy se podílejí na stavbě této membrány asi třiceti procenty, a jde především o lipidy polární – fosfolipidy (PL) (25 %), cerebrosidy (3 %) a cholesterol (2 %). [3] Cholesterol má mezi zástupci sterolů v mléce velkou převahu (>95%), avšak svým celkovým nízkým obsahem (~ 0,03 %) se zdaleka nevyrovná jiným produktům obsahujícím tuky. Asi desetina cholesterolu je obsažena v podobě esterů, ostatní jsou ve volné formě. V mléce se dále vyskytují stopy jiných sterolů, včetně steroidních hormonů. [2]

Zbýlých 70 % membrány vytvářejí proteiny (přednostně enzymy), které zajišťují interakci s okolím. Uvnitř kapének se nacházejí z 98 % triacylglyceroly (TAG), zbytek obsahu tvoří diacylglyceroly (DAG), cholesterol, malé procento PL a volných mastných kyselin (free fatty acids - FFA). Dále jsou ve vnitřním obsahu kuliček lokalizována stopová množství uhlovodíků, lipofilních vitaminů a dalších organických molekul, z nichž větší význam mají např. karotenoidy, jejichž množství ovlivňuje barvu mléčného tuku a podstatně se podílí na aktivitě vitamínu A. Za zmínku stojí i malé množství přítomných prostaglandinů, které ale nebyly v mléce hlouběji studovány, jelikož v biologicky aktivní formě nepřežijí skladování a podmínky zpracování. Průměrné složení mléčného tuku uvádí Tabulka 1.

Protože membránové PL jsou amfifilní, na povrchu tukových kuliček se orientují polární (fosfátovou) skupinou směrem do vodného roztoku mléka, naopak hydrofobní řetězce mastných kyselin směřují do vnitřního nepolárního prostředí, tvořeného TAG. Membránové proteiny jsou pak vázány na vnější polární fázi. [3] (viz obr. 1)

Tabulka 1 – Hlavní třídy mléčných lipidů (upraveno podle [7])

Skupina lipidů	Obsah [%]
Triacylglyceroly	98,3
Diacylglyceroly	0,3
Monoacylglyceroly	0,03
Volné mastné kyseliny	0,1
Fosfolipidy	0,8
Steroly	0,3
Karotenoidy	< 0,01
Vitaminy rozpustné v tucích	< 0,01
Chuťové látky	< 0,01



Obrázek 1 – Orientace bipolární membrány tukových kuliček [6]

2.1.1.1 Obsah mastných kyselin v mléčném tuku

Triacylglyceroly mléčného tuku jsou složeny z více než 400 různých mastných kyselin (Fatty Acids - FA), což činí z mléčného tuku nejkomplexnější přírodní tuk vůbec. Všechny tyto kyseliny jsou zde obsaženy jen ve stopových množstvích, pouze asi 15 z nich svým obsahem dosahuje 1%. Různorodost mastných kyselin závisí na řadě různých faktorů. Mastné kyseliny mohou mít původ v odlišnosti plemene, stádiu laktace, nebo se vytvářejí vlivem mléčného kvašení v žaludku nebo vemeni krávy. Významně se podílí také druh krmiva spolu se sezónními a regionálními vlivy. [3] Detailním biochemickým popisem syntézy mléčného tuku vč. původu mastných kyselin se zabývali mj. Jenness [5] nebo Fox a Mc Sweeney [2].

Genetické předurčení k produkci tučnějšího mléka vede ke zvýšenému obsahu FA s krátkým uhlíkatým řetězcem a naopak nižšímu obsahu FA s dlouhým řetězcem. Poměr produkovaných nízkouhlíkatých FA se v závislosti na stádiu laktace rovnoměrně s časem zvyšuje. Více než kterákoliv jiná komponenta stravy se na složení mléčného tuku, resp. mastných kyselin, podílí právě přijaté tuky. Změnou krmného režimu tak lze prokazatelně měnit složení produkovaného mléčného tuku. [8] [9] Vlivem letního a zimního krmení (pastva vs. konzervovaná krmiva) na složení významných FA se zabývá práce výzkumníků z Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích [10], z jejichž závěru vyplývá, že „v období pastvy má mléčný tuk z hlediska zdravotního výrazně vhodnější složení než

mléčný tuk dojníc krmených celoročně konzervovanými krmivy.“ Samková a kol. [10] také publikovali poměrně obsáhlou rešerši na téma „živočišné faktory ovlivňující složení mastných kyselin v kravském mléce.“ [11] Složení a vzájemné poměry FA ovlivňují nejen nutriční a senzorické, ale i významné technologické vlastnosti mléka, jako jsou krystalizace, oxidační stabilita nebo teplota tání. [8] Díky významné spojitosti mezi složením mléčného tuku suroviny a jakostí finálních výrobků se zmíněnou problematikou zabývá množství dalších vědeckých prací [12] [13] [14] [15] [16].

Obvyklý poměr nasycených (saturated fatty acids – SFA) a nenasycených FA (unsaturated fatty acids – UFA) obsažených v mléčném tuku je přibližně 70:30. Nejnižší podíl SFA, které jsou ve stravě považovány za méně žádoucí, byl prokázán v létě, kdy dobytek spásá travu, naopak v zimním období roste podíl SFA. Výsledky experimentu uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2 – Složení FA mléčného tuku v závislosti na ročním období (upraveno podle [17])

mastné kyseliny	mléčný tuk zima [hm %]	mléčný tuk léto [hm %]	průměr [hm %]
C4	3,7	3,6	3,7
C6	2,5	2,1	2,3
C8	1,5	1,2	1,4
C10	3,1	2,5	2,8
C10:1	0,3	0,3	0,3
C12	4	3	3,5
C14	11,8	9,1	10,4
C14:1	2	2	2,0
C15	1,2	1,1	1,2
C16	32,4	24,2	28,3
C16:1	2,6	2,6	2,6
C17	0,8	0,6	0,7
C17:1	0,2	0,3	0,3
C18	9,7	13	11,3
C18:1 cis	18,5	25,4	22,0
C18:1 trans	2,8	4,8	3,8
C18:2 cis-cis	2,1	2,3	2,2
C18:2 konj. Cis-trans	0,4	1	0,7
Cis18:3	0,3	0,8	0,6
SFA celkem	70,8	60,5	65,6
MUFA (cis + trans) celkem	26,4	35,4	30,9
PUFA (cis + trans) celkem	2,8	4,1	3,5

Existují snahy o nahrazení některých zdravotně neprospěšných SFA jinými mastnými kyselinami, čehož lze docílit rovněž zaměřením na stravu krav. Toto téma zpracovává např. Hillbrick a Augustin. [12], nebo Dalemans [17], který si nechal patentovat metodu na snížení obsahu SFA v mléce.

Z kvantitativního hlediska má v mléčném tuku největší význam mezi SFAs kyselina palmitová (16:0), jejíž obsah tvoří zhruba 30 % celkového obsahu FA. Dále jsou procentuálně nejvíce zastoupeny kyseliny myristová (14:0) a stearová (18:0). Kolem 11 % SFA potom tvoří nízkouhlíkaté kyseliny (C4:0 – C10:0), z nichž podstatnou část tvoří

kyselina máselná (4:0) a kapronová (6:0). Přibližně 25 % celkových FA tvoří kyseliny mononenasycené (monoenové, Monounsaturated Fatty Acids - MUFA) se zastoupením kyseliny olejové (18:1) kolem 24 %. Podrobnější zastoupení FFA v průměrném vzorku mléčného tuku udává Tabulka 3.

Tabulka 3 – Hlavní mastné kyseliny mléčného tuku (zpracováno podle [18])

označení FFA	triviální název	systematický název	obvyklé složení	
			hm. %	mol %
4:0	Máselná	Buthanová	3,7	9,6
6:0	Kapronová	Hexanová	2,4	4,7
8:0	Kaprylová	Oktanová	1,5	2,3
10:0	Kaprinová	Dekanová	3,2	4,2
12:0	Laurová	Dodekanová	3,6	4,1
14:0	Myristová	Tetradekanová	11,1	11,0
14:1	Myristolejová	cis-9-Tetradekanová	0,9	0,9
15:0	-	Pentadekanová	1,2	1,1
16:0	Palmitová	Hexadekanová	28,3	25,3
16:1	Palmitolejová	cis-9-Hexadekanová	1,6	1,5
18:0	Stearová	Oktadekanová	11,8	9,5
18:1	Olejová	cis-9-Oktadekanová	18,8	15,4
18:1	Vakcenová	trans-11-Oktadekanová	4,2	3,4
18:2	Linolová	cis, cis-9,12-Oktadekanová	1,4	1,1
18:2c	Linolová (konjgovaná)	cis, trans-9,11-Oktadekanová	1,1	0,9
18:3	Linolenová (alfa)	cis, cis, cis-9,12,15-Oktadekanová	0,9	0,8
	Minoritní kyseliny		4,4	3,7

2.2 Lipidy (a další složky mléka) jako zdroj senzorických vlastností sýrů

2.2.1 Termické působení

Tepelné ošetření mléka, jako jsou například pasteurace nebo odpařování, působí vznik různých žádoucích i nežádoucích chemických změn, které mají vliv na strukturu, chuť i aroma mléka a mléčných výrobků.

Takovým způsobem degradují například mléčné lipidy za vzniku alkan-2-onů. Celý proces termické degradace lipidů popisuje např. Nawar [19]. Dále jsou to reakce postranních řetězců aminokyselin (AMK) v proteinech, kdy se uvolňuje sirovodík a jiné aromatické sirné sloučeniny. V neposlední řadě jsou to Maillardova a Streckerova reakce, které se účastní redukcující cukr – laktóza a aminoskupina postranního řetězce aminokyseliny lysinu, za vzniku širokého spektra aromaticky aktivních látek, jako jsou např. Streckerovy aldehydy, furfuraly, thiazoly, pyraziny a jiné.

Toto je výčet pouze několika málo chemických změn, které jsou důsledkem zahřívání mléka. Vlivem zvýšené teploty dochází i k dalším reakcím, jako jsou hydrolýza peptidových vazeb, defosforylace proteinů atd., ale tyto nejsou tolik podstatné z hlediska senzorických změn sýru. [20]

2.2.2 Autooxidace lipidů

Oxidace lipidů je autokatalytická radikálová reakce, která v sýrech probíhá především díky přítomnosti UFA. Z tohoto důvodu se jedná předně o FA vázané ve fosfolipidech vnější membrány tukových kuliček, kde se UFA vyskytují mnohem četněji, než jako součást TAG ve vnitřním prostředí kuliček. Zároveň jsou tyto FA i lépe přístupné, protože se nacházejí na povrchu tukových kuliček. Nasycené postranní řetězce sice mohou také podléhat oxidaci, ale methylenová skupina ($-\text{CH}_2-$), umístěná mezi dvojnými vazbami, je k oxidaci mnohem náchylnější. Důsledkem působení vzdušného kyslíku, nebo jiného oxidačního činidla (některé kovy), dochází k odtržení vodíku a vzniku radikálů FA. V průběhu propagace a terminace poté vznikají nestabilní hydroperoxy, které dále reagují například za vzniku nenasycených karbonylových sloučenin, které jsou hlavní příčinou nežádoucího aroma. Vzhledem k základním principům radikálových reakcí je zřejmé, že obsah oxidačních metabolitů má v průběhu času stále stoupající tendenci. [2] [21] [22]

2.2.3 Fermentace bakteriemi mléčného kvašení

2.2.3.1 Glykolýza

Startovací kultury (bakterie mléčného kvašení – BMK) fermentují v průběhu zpracování sýrů laktózu (převážně L - laktózu) na kyselinu mléčnou, která dává sýru nakyslou chuť, charakteristickou pro fermentované mléčné výrobky. Kyselina mléčná je však často substrátem pro další fermentaci. [20]

Kultury rodu *Propionibacterium* dále metabolizují kyselinu mléčnou na kyselinu propionovou a CO_2 . Kyselina propionová způsobuje lehce oříškovou chuť a tvorba oxidu uhličitého má za následek vznik sýrových ok, která jsou charakteristická pro sýry švýcarského typu, kde se propionová kultura využívá. Dále může docházet k oxidaci laktátu za vzniku kyseliny octové, která má však často na chuť a aroma potravin negativní vliv, a proto je snahou co nejvíce omezit syntézu a obsah této kyseliny v potravinových výrobcích.

Fermentací laktózy vznikají také některé aromatické karbonylové sloučeniny. Acetaldehyd je podstatným metabolitem bakterií *Streptococcus thermophilus*, které se používají především pro produkci jogurtů. Co se sýrů týká, mnohem podstatnější jsou kultury *S. diacetylactis* a *Leuconostoc cremoris*, které produkují diacetyl, působící sladké, máslové aroma. [23]

2.2.3.2 Proteolýza

Během zpracování a zrání sýrů dochází k postupnému štěpení bílkoviny kaseinu působením široké škály proteolytických enzymů. Správný průběh proteolýzy je obecně považován za nutný předpoklad pro vývin kýžené chuti sýru.

Produkty proteolýzy (např. peptidy a volné AMK) význačně ovlivňují chuť sýru, mohou přispívat i k nežádoucím chutím (hořkost způsobená peptidy z nepolárních AMK), ale běžně neovlivňují aroma. Sloučeniny pramenící z katabolismu volných AMK se však na chuť i aroma přímo podílejí. Tématem vlivu konkrétních AMK a produktů jejich katabolismu na senzorické vlastnosti sýrů se zabývá množství literatury [24] [25].

Kromě volných AMK a peptidů vznikají degradační mléčných proteinů v sýru i další senzoricky velmi významné sloučeniny, nazvané Streckerovy aldehydy. AMK po reakci s karbonylovými sloučeninami mohou podléhat tzv. Streckerově degradaci, při které dochází k uvolnění CO_2 z karboxylové skupiny a vzniká aldehyd o jeden uhlík kratší, než původní AMK. K popsané reakci dochází při zahřívání laktózy v přítomnosti AMK, případně fermentací laktobacily.

Působením vyšší teploty dochází také k reakcím sirných aminokyselin za tvory chuťově charakteristických merkaptanů, sulfidů a polysulfidů. [23]

2.2.3.3 Lipolýza

Jako všechny tučné potraviny, také mléčné produkty podléhají oxidačním a lipolytickým změnám. K lipolýze v sýrech dochází díky přítomnosti dvou skupin enzymů – esterasy a lipas. Esterasy hydrolyzují řetězce o délce 2 až 8 uhlíkových atomů, zatímco lipasy odštěpují acylestery 10 a více uhlíků dlouhé. Tyto enzymy mohou pocházet ze samotného mléka, z procesu přípravy syřidla, nebo mohou být produktem startovacích a dalších přídavných bakteriálních kultur, kvasinek a plísní. Vliv konkrétních mikroorganismů na chuť a vůni různých typů sýru je podrobně prozkoumán a publikován. [26] Mléčné enzymy mohou být denaturovány pasterací. Mikroorganismy používané jako kultury pro výrobu mléčných produktů se však mohou velmi lišit svými lipolytickými schopnostmi, a některé z nich (tzv. psychrotrofní) také produkují enzymy termostabilní.

Enzymatická hydrolýza tuku má tedy za následek vznik FFA, mono- a diglyceridů, nebo samotného glycerolu. FFA významně přispívají k aromatu sýrů. Jednotlivé FFA, obzvláště kyseliny mezi $C_{4:0}$ a $C_{12:0}$, jsou nositeli specifických chutí, které je možno rozlišovat v různých typech sýrů. Intenzita chuti FFA nezávisí pouze na jejich koncentraci, ale také na distribuci mezi vodnou a lipidickou fází, pH a přítomnosti konkrétních kationtů (např. Na^+ , Ca^{2+}) a degradačních produktů proteolýzy. [20] Obecně jsou FFA uvolňovány lipasami na povrchu tukových kuliček. Kyseliny reagují s pufrý, přítomnými u povrchu kuliček, a rozdělí se na rozhraní vodného a hydrofobního prostředí. Nejkratší FA, jako jsou máselná, octová nebo propionová, se nacházejí převážně v mléčné plazmě. S rozsahem proteolýzy rovněž stoupá množství FFA akumulované na rozhraní a ve vodné fázi. [23] Hodnota pH pak ovlivňuje přítomnost kyselin ve formě jejich solí, které jsou netěkavé, což snižuje jejich sensorický příspěvek.

Již nízká hladina lipolytické aktivity může být sensoricky detekována jako žluklost. Přesto, například co se zrajících sýrů týká, je lipolýza v průběhu zrání žádoucí a nezbytná pro vznik charakteristického aroma. [27] Rozsáhlé informace o lipolytických aktivitách a jejich měření v sýrech podává ve své knize Fox [28].

2.3 Možnosti stanovení mastných kyselin v sýru

Informace o složení mastných kyselin lipidů je důležitá z hlediska identifikace druhu suroviny, posouzení stability vůči oxidaci, což souvisí se sledováním technologických procesů, a v neposlední řadě z důvodu hodnocení nutriční a biologické hodnoty potraviny (esenciální FA)

Analytický postup pro stanovení jednotlivých lipidových sloučenin zahrnuje tři základní kroky - extrakci ze vzorku, analytickou separaci a identifikaci, příp. kvantifikaci.

V následujících kapitolách jsou stručně popsány možnosti stanovení FA, a především FFA, přičemž hlavní pozornost je věnována izolační/frakcionační metodě extrakce tuhou fází, která je aplikována v experimentální části této práce.

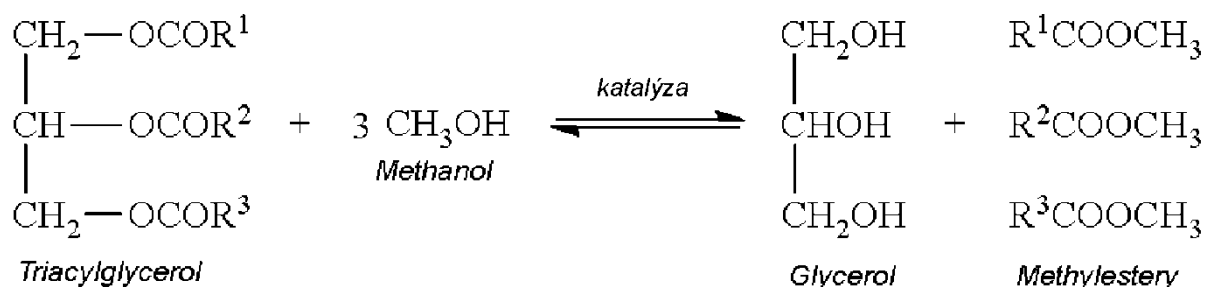
2.3.1 Stanovení celkového obsahu mastných kyselin

Celkový obsah (volných i vázaných) mastných kyselin se nejčastěji stanovuje pomocí plynové chromatografie (GC). Stanovení na GC zahrnuje analýzu plynné směsi, obvykle odpařeného kapalného vzorku, který je unášen mobilní fází (směsí plynů) a na chromatografické koloně rozdělen na složky podle jejich afinity ke stacionární fázi. Zadržené složky jsou následně analyzovány detektorem, nejčastěji plamenově – jonizačním (FID).

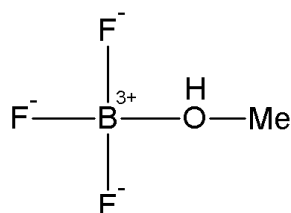
Většina lipidů se v plynném skupenství nevyskytuje, a proto jejich analýza na GC vyžaduje předchozí derivatizaci na těkavé sloučeniny.

Po extrakci tuku se proto FA derivatizují, nejčastěji na methylestery, které je pak možno na GC stanovit. Nejnovější studie se však zabývají také výhodami převodu mastných kyselin na butylestery [29], případně silylestery [30]. Se vzniklými deriváty je potřeba kvůli jejich těkavosti pracovat v inertní atmosféře (N₂) [31] [32] [33]. K derivatizaci je možno použít methanol za účasti kyselého (BF₃) nebo bazického (KOH) katalyzátoru. (obr. 2) V případě kyselého katalýzy dochází k tzv. Fischerově esterifikaci, které podléhají volné i estericky vázané FA, neboť se jedná o reakci reversibilní. Naproti tomu bazicky katalyzovaná reakce může proběhnout pouze ve smyslu transesterifikace, na FFA nepůsobí, protože bazická hydrolýza (zmýdlnění) tuku je reakcí nevratnou. [34] Při této reakci působením methoxidového iontu na karboxylovou kyselinu vzniká karboxylátový ion, nikoliv methylester. Tento mechanismus je podpořen studiemi izotopově značených reaktantů. Více podrobností uvádí ve své knize McMurry. [35] Možnostem přípravy methylesterů mastných kyselin pro GC se rozsáhle věnuje množství odborných studií [36] [37]. Jednu z mnoha GC metod pro stanovení FFA v sýru popsal např. Martin-Hernandéz a kol. [38]

Nejčastěji používanou esterifikační metodou pro tyto aplikace je esterifikace katalyzovaná bortrifluoridem, přestože norma ČSN EN ISO 12966-2 [34], použitá v rámci experimentální části této práce (kap. 3.3.4.3) uvádí, že zmíněná metoda není pro mléčný tuk vhodná. Bortrifluorid ve funkci esterifikačního katalyzátoru nejprve vytváří komplex s methanolem (obr. 3). V případě vzorku obsahujícího kromě FFA i acylglyceroly jsou tyto nejprve zmýdlněny methanolickým roztokem hydroxidu sodného, a vzniklá mýdla mohou být následně spolu s FFA přeměněny na methylestery reakcí s methanolickým komplexem BF₃.



Obrázek 2 – Derivatizace FA (upraveno podle [39])



Obrázek 3 – Methanolický komplex bortrifluoridu

2.3.2 Jednoduché metody kvantifikace volných mastných kyselin

Pro některé účely není potřeba identifikovat jednotlivé přítomné FFA, postačuje stanovit jejich relativní obsah. S tímto záměrem je možno použít rychlejší, avšak méně přesné metody, než jsou chromatografická stanovení. [40]

Přehled o celkovém obsahu FFA v sýru lze získat například klasickou titrační metodou stanovení čísla kyselosti, která se běžně používá např. pro mléko nebo zmrzlinu. Mléčný protein je dispergován detergentem za současného uvolnění tuku, který je dále oddělen do rozpouštědla. Následuje alkalimetrická titrace (např. alkoholickým roztokem KOH), kdy dochází k neutralizaci FFA až do bodu ekvivalence, indikovaného fenolftaleinem. Stupeň kyselosti (obsah FFA) se stanoví ze spotřeby titračního činidla. [32] Zásadním nedostatkem této metody je nízká koncentrace detekovaných kyselin s krátkým řetězcem, které jsou hydrofilnější, a proto často po rozražení tuku zůstávají ve vodné fázi.

Další metoda, která však rovněž nedokáže příliš dokonale kvantifikovat krátké kyseliny, je založená na tvorbě měďnatých solí, extrahovaných směsí nepolárních rozpouštědel. Následuje UV spektrofotometrické stanovení, při kterém dochází k absorpci záření, úměrné koncentraci extrahovaných solí. Aplikace hydrofilnějších rozpouštědel za účelem získu krátkých kyselin vede k nežádoucímu přechodu organických kyselin (např. kyseliny mléčné) do extraktu. [41]

Extrakčně – titrační metoda využívá k uvolnění lipidů pro extrakci kyselinu chlorovodíkovou a kyselinu křemičitou k adsorpci interferujících PL. Promývání dalšími kyselinami je použito pro odstranění organických kyselin a následuje opět kvantifikace alkalimetrickou titrační metodou. Z uvedených tří metod je ekstrakčně – titrační metoda nejspolehlivější a výsledky nejvíce korelují s daty získanými pomocí GC. [42]

2.3.3 Metody izolace volných mastných kyselin

Jak již bylo zmíněno, nejčastěji používanou instrumentální technikou pro detekci FFA je plynová chromatografie. Pro identifikaci FFA v sýru pomocí GC je nejprve zapotřebí získat tukový extrakt, který je dále za účelem izolace frakce FFA nutno přechistit vybranou metodou. [43]

2.3.3.1 Chromatografie na tenké vrstvě

Jednou z metod separace směsi lipidů je chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Mnoho experimentů využívá metodu TLC spíše jako prostředek pro kontrolu při vývoji jiných separačních technik a jako rychlou identifikaci přítomných lipidických skupin, protože při srovnávacích experimentech se TLC ukázala být méně výtěžná, než některé jiné metody, například extrakce tuhými fázemi (SPE) (kap. 2.3.4). Dalšími známými nedostatky jsou oxidace nenasycených lipidů během procesu separace a problémy vznikající při překročení množství aplikovaného vzorku, případně jeho přílišná komplexnost. [30] Přesto je TLC pro některé autory oblíbenou technikou, obzvláště díky své flexibilitě, rychlosti a ekonomičnosti. Metoda TLC pro frakcionaci lipidů je popisována na stříbrných nebo reverzních, ale nejčastěji na silikagelových stacionárních fázích.

Po aktivaci destičky a nanesení vzorků na startovní čáru se chromatogram vyvíjí postupem mobilní fáze, tvořené několika rozpouštědly v optimalizovaném poměru. Součástí eluční směsi je kyselina octová nebo mravenčí, z důvodu uchování volných mastných kyselin v plně protonované formě. Bez přítomnosti kyseliny by FFA migrovaly mezi DAG a MAG. Pro identifikaci složek se používá např. sprejování činidlem s obsahem putresceinu, kterým lze detekovat skvrny pod UV lampou. Je nutné používat vizualizační činidlo, které neinteraguje se stanovovanými lipidy a je jednoduše odstranitelné během procesu izolace. Dalšími používanými činidly jsou alkoholické roztoky kyseliny sírové nebo fosfomolybdenové, které

jsou vhodné pro modifikované i neupravené stacionární fáze. Spolehlivé výsledky byly dosaženy také sycením vrstvy parami sulfuryl chloridu. Tato metoda je však použitelná pouze pro silufol nebo tenkovrstvou chromatografii na stříbrných iontech. Po ukončení vyvíjení je TLC destička zahřata a koncentrace lipidové složky je úměrná intenzitě zabarvení příslušné skvrny. K měření intenzity tohoto zabarvení je možné použít skenování denzitometrem. Kvalitativní analýza se provádí nanesením směsi standardů a vývinem na téže destičce spolu se stanovovaným vzorkem. [43] [44] [45]

2.3.3.2 Mikroextrakce tuhou fází

Mezi metodami zakoncentrování vzorku pro GC analýzu se stala velmi oblíbenou metoda HS-SPME (Headspace-Solid Phase Microextraction), která je prokazatelně úspěšná na poli potravinového aroma a obzvláště při stanovení sloučenin zodpovědných za chuť a vůni sýrů. [46] Pokud se jedná o stanovení FA, SPME není metodou pro kompletní stanovení FFA, hodí se však pro nízkouhlíkaté a těkavé kyseliny. [47] Dostupné zdroje uvádějí některé experimenty v rámci analýzy sýrů, jejichž součástí je srovnání SPME a SPE. [46]

Mezi přednostmi SPME patří rychlé zhodnocení vzorku, bez nutnosti předchozí složité přípravy vzorku, která bývá pro jiné metody časově náročná a vyžaduje množství organických rozpouštědel. Při přípravě vzorku je důležité hlavně ředění vzorku (případný rozklad matrice atd.) a správné pH. Studie totiž prokazují, že se správně přizpůsobeným pH vzorku rapidně vzrůstá plocha píku detekovaných FFA. Je doporučeno zajistit pH roztoku alespoň o dvě hodnoty pK_a níže, než je pK_a volných mastných kyselin, protože jen tak se kyseliny nacházejí ve formě, kterou je vlákno schopno navázat, což je způsobeno mj. také sníženou interakcí mezi FFA a proteiny matrice. Jediným potenciálním rizikem snížení pH je případná hydrolýza a uvolňování FA např. z triacylglycerolů. [48] Pro stanovení FFA je vhodné optimalizovat dobu, po kterou je vlákno vystaveno adsorpčnímu prostředí. Studie Wijesundera a kol. [44] např. uvádí, že po 30 minutách se již koncentrace zachycených kratších FFA nemění, zatímco vyšší kyseliny v tomto časovém horizontu ještě nedosahují rovnováhy s polyakrylátovou fází vlákna. Půl hodiny však v případě této studie bylo zvoleno za optimum, protože vyšší kyseliny nemají podíl na senzorických vlastnostech sýru a tedy není potřeba je důkladně kvantifikovat. [49] Další možností pro modifikaci metody je přidavek soli, který také může zvyšovat výtěžnost, díky snížení rozpustnosti FFA s krátkým řetězcem ve vodě. Obvyklou aplikací je spojení SPME s GC/MS případně GC-FID.

2.3.3.3 Superkritická fluidní extrakce

Další metodou vhodnou pro izolaci a stanovení těkavých látek z komplexních matric je SFE (Supercritical Fluid Extraction) ve spojení s GC. Jedná se o extrakci chemicky inertním oxidem uhličitým v nadkritickém stavu za relativně nízké teploty. Extrakční plyn je netoxický, levný a po extrakci snadno odstranitelný. Jde o rychlou metodu, která navíc zaručuje minimální riziko ztráty těkavých FFA, na rozdíl od konvenčních metod (destilace s vodní parou aj.), kdy je potřeba volné kyseliny před GC stanovením nejprve derivatizovat. FFA vykazují odlišnou rozpustnost, a tím i delší čas extrakce, v závislosti na délce uhlíkatého řetězce. [50] SFE je relativně nová metoda, která přináší spolehlivé výsledky za cenu minimálních rizik a nutnosti manipulace s rozpouštědly, a proto se její použití rychle rozšiřuje také v rámci analýzy senzoricky aktivních látek sýrů. [51] [52] [53]

2.3.3.4 Extrakce tvorbou tetramethylamoniových mýdel

Jednou z málo popsanych metod pro stanovení FFA v sýrech je proces, při kterém je možné získat pro GC stanovení methylestery volných a vázaných FA v oddělených frakcích v jediném kroku. Metoda zahrnuje přidavek tetramethylamonium hydroxidu (TMAH) jako

esterifikačního katalyzátoru, jehož působením jsou glyceridy přímo transesterifikovány při pokojové teplotě a do spodní fáze se oddělí FFA ve formě TMA mýdel, která při zvýšené teplotě pyrolyzují za vzniku methylesterů. [38] Toho se s výhodou využívá při GC stanovení, kdy k pyrolýze dochází přímo v injektoru plynového chromatografu. Obvyklými problémy této metody jsou interference TMA při GC stanovení nebo současná extrakce jiných kyselin, např. kyseliny mléčné. Další omezení vznikají díky zřejmým sekundárním reakcím, kdy mastné kyseliny během extrakce mohou disociovat do nepříslušející vrstvy. Rizika této metody také spočívají v citlivosti TMAH na pH, což může v důsledku vést ke ztrátám nízkomolekulárních FA. Možná řešení těchto negativních aspektů a validace celé metody jsou pro stanovení v sýru a mléčných produktech ověřována. [29] [38]

2.3.4 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction – SPE) je další technikou přípravy vzorků, často používanou pro izolaci a frakcionaci lipidů. Tato metoda je poměrně nová (první aplikace byly publikovány během uplynulých dvou desetiletí [54]) a velmi rychle se uchytila např. jako náhrada tradiční extrakce na kapalných fázích (LLE), kapalinové (LSC) nebo tenkovrstvé chromatografie (TLC). [45] Separace lipidů může být pojata jednoduše, jako oddělení polární a nepolární frakce, nebo komplexně, kdy dochází k separaci a izolaci TAG, FFA, sterolů, sterylesterů, glykolipidů, PL atd. Rešerši publikovaných postupů pro separaci jednotlivých tříd lipidů pomocí SPE a jejich srovnání nedávno vypracovali Ruiz-Gutiérrez a Pérez-Camino. [30] Předúprava vzorku rovněž často slouží k odstranění interferencí matrice, případně k zakoncentrování analytu. [43]

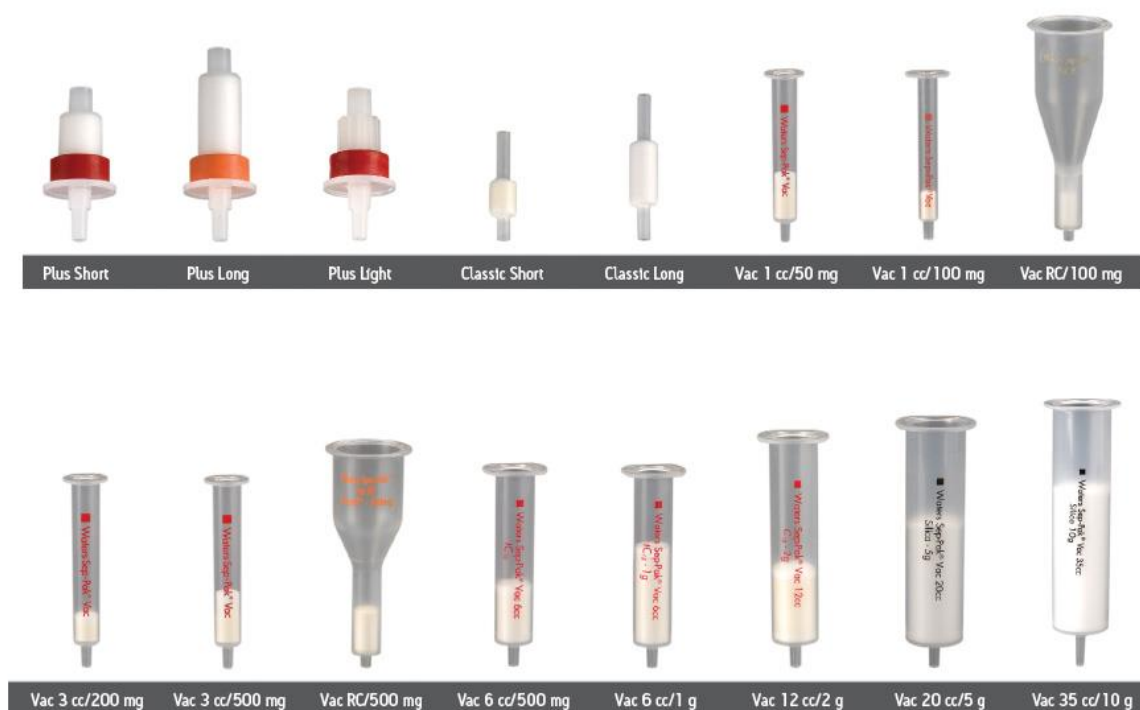
2.3.4.1 Výhody a nevýhody

Mezi hlavní výhody SPE (v porovnání s LLC) patří nižší nároky na čas, spotřebu rozpouštědel i finanční prostředky, a také výborná reprodukovatelnost. Oproti HPLC si navíc SPE díky větším rozměrům částic a pórů vystačí s mnohem nižším tlakem, dosažitelným zapojením obyčejné vodní vývěvy. SPE lze uplatnit jako samostatnou metodu, v posledních letech se však často setkáváme s automatizovanými technikami, které pracují v on-line módu. Takto je možné zpracovávat více vzorků zároveň a není tak potřeba jakákoliv manipulace se vzorkem mezi jeho přečištěním a analýzou. První a stále moderní tandemovou aplikací je spojení SPE – HPLC, vzhledem ke kompatibilitě vodných mobilních fází, které jsou často pro přírodní materiály příhodné. Spojení s GC je méně časté, především kvůli složitému propojení vodné a suché (plynné) mobilní fáze. O výhodách automatizovaného provozu [55] a nabídkách veškerého sortimentu se lze dočíst přímo na webových stránkách výrobců SPE produktů (např. Waters, Thermo scientific, Agilent technologies, Supelco aj.), kterých je dnes již více než 50. [56] Na druhou stranu, SPE má oproti LLE a dalším metodám také některé nedostatky. Mezi ně patří například povrchové interakce a s nimi spjaté sorpční vlastnosti pevných fází, které nejsou tak dobře reprodukovatelné, jako u fází kapalných. Pevné fáze jsou také mnohem náchylnější na kontaminaci během zpracování a balení materiálů, což může vést k četným interferencím. Dalšími problémy jsou limitovaná sorpční kapacita, nehomogenita sorbentu nebo ucpávání pórů sorbentu, které mohou negativně ovlivňovat separaci a výtěžnost. Jednou z obávaných komplikací je tzv. bod průniku, který se objeví při přetížení kolonky, zablokování pórů sorbentu, příliš velkém průtoku, nebo nesprávné volbě rozpouštědel. [43] [57]

2.3.4.2 Instrumentace a rozvoj techniky

SPE techniky se se svými možnostmi a vybavením stále vyvíjejí. První oblastí nových trendů je prostorová forma separačního zařízení. Nejčastěji se setkáváme s jednorázovými baleními

plastovými kolonkami ve stylu injekční stříkačky se stacionární fází zakotvenou mezi dvěma porézními vrstvami (fritami). [56] (obr. 4) Někteří výrobci uvádějí také možnost vícenásobného použití kolonek. Tato varianta byla ověřena v rámci diplomové práce Sýkory [58]. Pro vyšší průtočnou plochu, kapacitu a účinnost zádrže vzorku jsou také oblíbené SPE disky, které však není možné připravit s tak rozsáhlou řadou stacionárních fází. [45] V automatizovaném pojetí lze pro malé objemy a velké množství vzorků použít tzv. „96 - well plates“, které jsou konstruovány jako předem plněné polypropylenové „nádoby“ s 96 čtvercovými pozicemi, každá pro objem 2 ml. Další formou, užitečnou pro malé objemy, jsou sorpční mikroválky, která byla poprvé uvedena na trh v roce 1992 jako nová metoda, takzvaná mikroextrakce tuhou fází (SPME), o které bylo krátce pojednáno v kapitole 2.3.3.2. Mimo různých forem a možností automatizace přichází SPE s rostoucí škálou sorbentů, které proto umožňují separaci analytů o různých chemických vlastnostech na principu normálního, reverzního i jontoměničového rozdělení. [56] [57] Veškeré alternativy vč. řešení problémového zadržování nejpolarnějších analytů pomocí hydrofilních sorbentů uvádí ve své práci Fontanals a kol. [59].



Obrázek 4 – Různé typy SPE kolonek [60]

2.3.4.3 Princip separace

Stacionární fáze jsou připraveny tak, že na pevnou fázi (obvykle se jedná o silikagel nebo modifikovaný silikagel) jsou kovalentně zakotveny specifické organické funkční skupiny. Procházející analyt se díky svým chemickým vlastnostem více či méně adsorbuje na tyto organické zbytky za účasti iontových, polárních, vodíkových, nebo nepolárních interakcí. [61] Po rozdělení vzorku mezi mobilní a stacionární fázi, na základě jeho afinity k těmto fázím, jsou složky analytu postupně eluovány proměnnou polaritou a eluční silou mobilní fáze. Eluční rozpouštědla způsobují desorpci složek analytu. Obecně lze říci, že silný eluent je takový, který se svou chemickou podstatou a polaritou podobá stacionární fázi, a tedy má

schopnost vytěsnit zadržovanou složku analytu zrušením interakcí mezi složkou a sorbentem. [43] Stacionární fáze se rozdělují podle vázaných funkčních skupin a pomocí mnohé literatury lze dohledat vhodnou variantu i běžná eluční činidla pro konkrétní účel. Komerčně dostupné, ale i vysoce specifické stacionární fáze a nejnovější trendy jsou v těchto zdrojích rovněž diskutovány. [57] [59] [60]

2.3.4.4 Metodologie

Klasická SPE zahrnuje čtyři základní kroky: kondicionování kolonky, aplikace vzorku, proplach sorbentu a eluce analytu. Vývoj jakékoliv metody vyžaduje optimalizaci každého z těchto čtyř kroků pro zajištění přesných a reprodukovatelných výsledků. Aktivace kolonky má zajistit odstranění nečistot a smáčení povrchu silanolových nebo vázaných skupin pro co nejlepší kontakt mezi kapalnou a pevnou fází. Nečistoty mohou být odstraněny rozpouštědlem silnějším než je eluční rozpouštědlo a hlavní průplach se provádí pokud možno rozpouštědlem, ve kterém je solvatován vzorek. Toto rozpouštědlo musí mít nízkou afinitu vůči stacionární fázi, aby byly složky analytu co nejlépe a kvantitativně zachyceny. Pro normální fáze (polární) jsou tedy typickými rozpouštědly např. hexan, toluen a dichlormethan. Voda a pufrý jsou naopak používány jako rozpouštědla při separaci na reverzních fázích. Proplachováním sorbentu po retenci vzorku jsou odstraněny nežádoucí komponenty, rozpouštědlo by však nemělo eluovat žádnou ze složek zájmu. Finálním krokem SPE metody je uvolnění analytu elučním činidlem, zachycený eluát může být dále analyzován. [43] [60]

2.3.4.5 Použití SPE pro frakcionaci lipidů

Směsi lipidů z přírodních a biologických materiálů byly již na SPE kolonkách separovány užitím rozmanitých stacionárních fází. Jednou z méně používaných metod je retence na reverzní (např. oktadecylové) fázi, nepolárním sorbentu, který vzniká reakcí se siloxanovými deriváty a navázáním C_{18} na místo silanolové skupiny silikagelu. Tento přístup je vhodný pro izolaci lipidů solvatovaných v polárních rozpouštědlech, např. ve vodných roztocích. Eluce analytu je zajištěna zařazením nepolárních rozpouštědel (methanol, ethylacetát, acetonitril aj.), které mají schopnost překonat van der Waalsovy síly, odstranit polární nelipidické komponenty a s klesající polaritou postupně vymývat eluát. Separace na reverzní fázi byla použita například pro izolaci fosfatidylcholinu, cerebrosidů, sulfatidů a gangliosidů z matric rozpustných ve vodě. [43] [54]

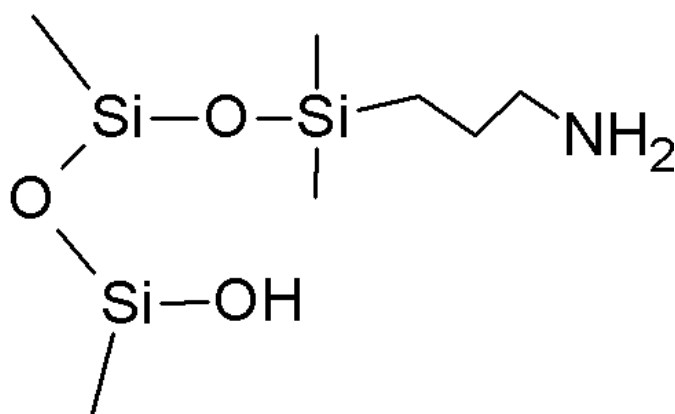
Nejširší využití SPE pro frakcionaci lipidů mají sorbenty se zakotvenými polárními skupinami (normální fáze). Jednou z možných aplikací jsou nemodifikované silikagely, které dobře fungují pro vzorky uchovávané v nepolárních rozpouštědlech, jako je chloroform. Polární silanolové skupiny velmi silně zadržují nejpolárnější složky (např. PL), mnohem méně jsou poutány neutrální lipidy (např. TAG, steroly). Proto je křemičitanová fáze dobrou volbou pro jednoduché oddělení polárních a nepolárních lipidů. Středně kyselá povaha silanolů může mít za následek také příspěvek jontově-výměnných mechanismů. [43] Rozsáhle citovanou a dále inovovanou aplikací je metoda podle Hamiltona a Comaie [62], kteří po oddělení PL dále separovali FFA od neutrálních lipidů pomocí HPLC. O několik let později byla metoda zdokonalena kompletním SPE rozdělením fosfolipidů na kyselé a neutrální, a také získkem jednotlivých frakcí esterů cholesterolu, FFA, TAG a cholesterolu.

Pro komplexní frakcionaci lipidů na několik tříd jsou s oblibou používány vázané aminopropylkové fáze (obr. 5). Jako první tuto metodu popsal Kaluzny a kol. [44], podle kterých lze během krátké doby (1 - 1,5 h) sledem elucí na aminopropylkových kolonkách získat až 10 lipidických frakcí s výtěžností vyšší než 95 %. Aminopropylková fáze je polární a vykazuje vznik vodíkových vazeb mezi primární aminovou skupinou a polárními funkčními skupinami analytu, jako jsou OH, NH_2 , nebo SH skupiny. Proto složky analytu interagují více

či méně silně se stacionární fází, na základě přítomnosti těchto skupin. Například monoacylglyceroly (MAG) mohou interagovat s navázanou fází lépe, než DAG, které obsahují o jednu OH skupinu méně. Podobně cholesterol se svou OH skupinou se zadržuje silněji než estery cholesterolu. [43] [61] Některé zdroje uvádějí, že FFA spolu s PL patří mezi velmi polární lipidy, a proto je nutné je eluovat velmi silně polárními rozpouštědly [61]. Většina zdrojů se však shoduje na tom, že aminopropylové fáze mohou separovat také na principu slabých jontoměničů, a právě díky tomu jsou PL a FFA zadržovány na NH_2 kolonkách nejsilněji. [43] [45] [54] Tomuto mechanismu odpovídá i zmíněná metoda podle Kaluzny a kol. [44], podle níž jsou po promytí roztokem chloroform – propanol 2 : 1 eluovány všechny neutrální lipidy, které jsou po odpaření rozpouštědla a rozpuštění v hexanu dávkovány na novou kolonku a dalšími postupy separovány. Eluce FFA z původní kolony vyžaduje změnu pH eluentu k oslabení interakcí mezi karboxylovou skupinou FFA a aminoskupinou zakotvenou na kolonce. Toho je dosaženo použitím 2 % roztoku kyseliny octové v diethyletheru. Fosfolipidy jsou nakonec eluovány methanolem. Celé schéma separace uvádí autor ve své práci. [44] Z uvedené metody vychází experiment izolace FFA, popsáný v praktické části naší práce.

Také další autoři publikovali své postupy frakcionace lipidů na aminopropylových fázích. Agren a kol. [63] dosáhli až 98 % výtěžku esterů cholesterolu, TAG a FFA, izolovaných ze sérových lipidů na jedné kolonce. [63] Bateman a Jenkins [64] modifikovali metodu podle Kaluzny a kol. [44] pro dosažení lepší kvantifikace PL ze smíšených mikrobiálních kultur. [64] Flurkey [61] po několikaletých neúspěších opustil metodu podle Kaluzny a kol. [44], protože ani odstraňováním všech potenciálních zdrojů chyb nebyl schopen dosáhnout deklarovaných výsledků, stejně jako řada dalších. Ve své práci srovnává zmíněné metody podle Hamiltona, Agrena a Batemana, a tyto experimenty modifikuje. [61]

Pro frakcionaci lipidů syru použitím SPE je možno použít i jiné sorbenty, například kombinaci aminopropylových a silikagelových fází, čistě jontoměničové fáze nebo kolony s vázaným Al_2O_3 podle de Jong a Badingse [65]. Touto metodou na alumina sorbentu však v porovnání se separací na NH_2 sorbentech autor nedochází k tolik uspokojivým výsledkům. [43]



Obrázek 5 – Aminopropylová skupina zakotvená na silikagelu

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení a chemikálie

3.1.1 Plyny

- Dusík 5.0 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem a kovovou membránou;
- Vodík 5.5 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem;
- Vzduch 5.0 SIAD v tlakové lahvi s redukčním ventilem pro kyslík.

3.1.2 Přístroje

- Plynový chromatograf TRACE GC (Thermoquest Italia S. p. A., Itálie) s plamenově ionizačním detektorem, split/splitless injektorem a kapilární kolonou DB-23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
- SPE manifold (SUPELCO VISIPREP™)
- Počítač PC, Intel Pentium Procesor
- Analytické digitální váhy HeLAGO, GR-202-EC, Itálie
- Lednice
- Vodní lázeň se stojany, Julabo TW2
- Digestor
- Sušárna, Memmert
- Vakuová rotační odparka, KIKA WERKE – RV06-ML, s příslušenstvím

3.1.3 Pracovní pomůcky

- Mikropipeta Biohit-Proline (0,5 – 1000 µl)
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky
- SPE kolonky SampliQ Amino tubes 500 mg, 3 ml
- TLC destičky Silikagel 60, 20 x 20 cm, MERCK, Německo
- Vyvíjecí komora
- Hamiltonova mikrostříkačka
- Parafilm Pechiney PLASTIC PACKAGING
- Nůž, nůžky
- Vialky
- Ependorfovy zkumavky

3.1.4 Chemikálie

- Diethylether stabil. p.a., Lach-Ner, Česká Republika
- Ethanol 96 % p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Hexan p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Hydroxid draselný p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Chloroform p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Isooktan p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Jód
- Kyselina chlorovodíková 35 % p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Kyselina octová 99 % p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Methanol p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Petrolether p. a., Lach-Ner, Česká Republika
- Propanol čistý, LACHEMA, Česká Republika

- Standard methylesterů mastných kyselin, Supelco™ 37 Component FAME Mix SIGMA-ALDRICH, Německo
- Standardy FFA (kapronová, kaprylová, laurová, myristová, palmitová, stearová, olejová, linolová), SIGMA-ALDRICH, Německo
- Fluorid boritý (14% roztok v metanolu), p. a., SIGMA-ALDRICH, Německo
- Methyloranž
- Síran sodný bezvodý p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Heptan p. a., Lach-Ner, Česká republika

3.2 Analyzované vzorky

Jako testovací vzorky byly použity: slunečnicový olej zakoupený v běžné tržní síti a dále modelový tavený sýr vyrobený na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně standardním technologickým postupem.

Vzorky byly uchovávány v chladničce při teplotě 4 °C. Pro analýzu bylo potřebné množství oleje rozpuštěno v 1 ml hexanu. Tavený sýr byl promíchán a pomocí špachtle bylo odebráno množství potřebné k extrakci lipidů (kap. 3.3.1).

3.3 Použité metody

3.3.1 Extrakce lipidů ze vzorku dle normy ČSN EN ISO 1735

Ze vzorku taveného sýru byl na analytických vahách odvážen 1 g s přesností na 4 desetinná místa. Vzorek byl kvantitativně převeden do zkumavky a byl zahříván s 5 ml koncentrované HCl ve vodní lázni o teplotě 80 °C. Při zahřívání dochází k rozpouštění vzorku sýru, při kterém se mění barva směsi ve zkumavce z bezbarvé na temně fialovou až hnědou. Po rozpouštění vzorku sýru byla směs zahřívána ještě 10 minut, během kterých byl kontrolován únik plynu, projevující se pohybem zábrusové zátky. Po uplynutí stanovené doby byla směs ve zkumavce ochlazena pod tekoucí vodou a přidávkem 5 ml ethanolu kvantitativně převedena do dělicí nálevky. Tuk v dělicí nálevce byl extrahován 8,4 ml diethyletheru a stejným objemem petroletheru. Po protřepání a uplynutí 30 minut, které jsou nutné pro oddělení organické a vodné fáze roztoku, byla horní etherová vrstva oddělena do zvážené destilační baňky. Proces extrakce byl opakován ještě dvakrát za použití polovičního množství rozpouštědel, a byly sloučeny etherové fáze, obsahující lipidický extrakt. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce a lipidový extrakt byl po zvážení kvantitativně převeden 1 ml hexanu do Ependorfovy zkumavky. Proces přípravy extraktu je znázorněn na obrázcích 6 a 7. [66]



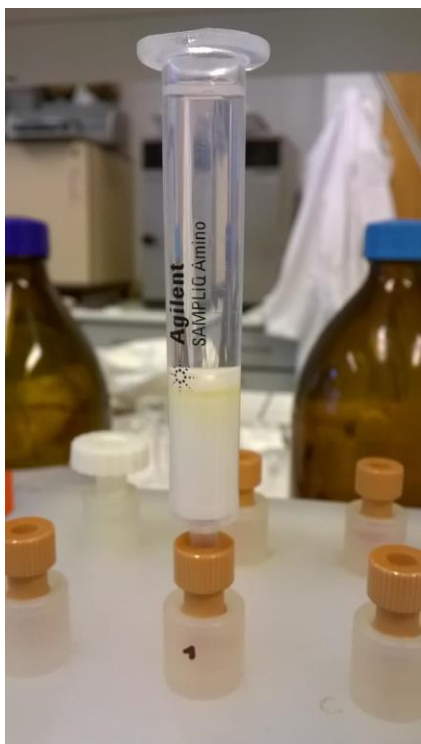
Obrázek 6 – Rozpouštění ve vodní lázni



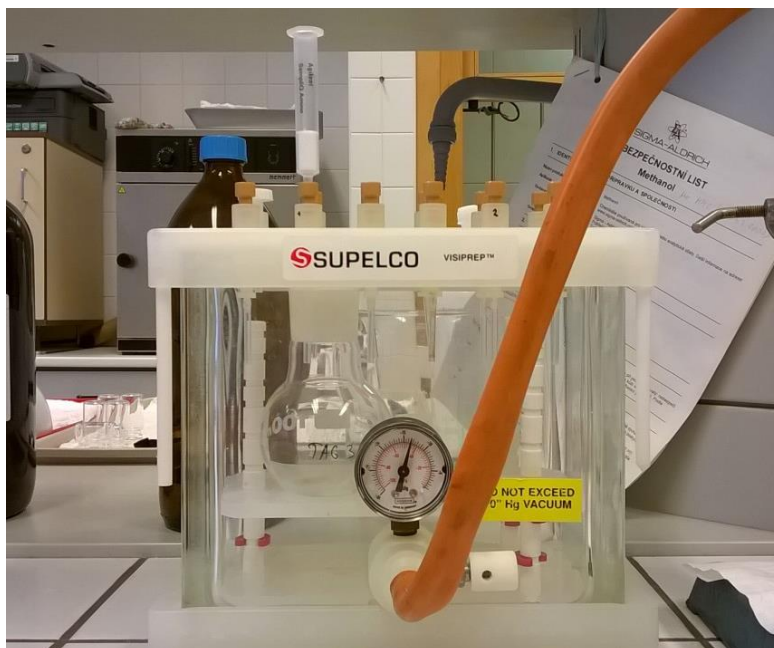
Obrázek 7 – Extrakce směsí etherů

3.3.2 Frakcionace lipidů metodou SPE

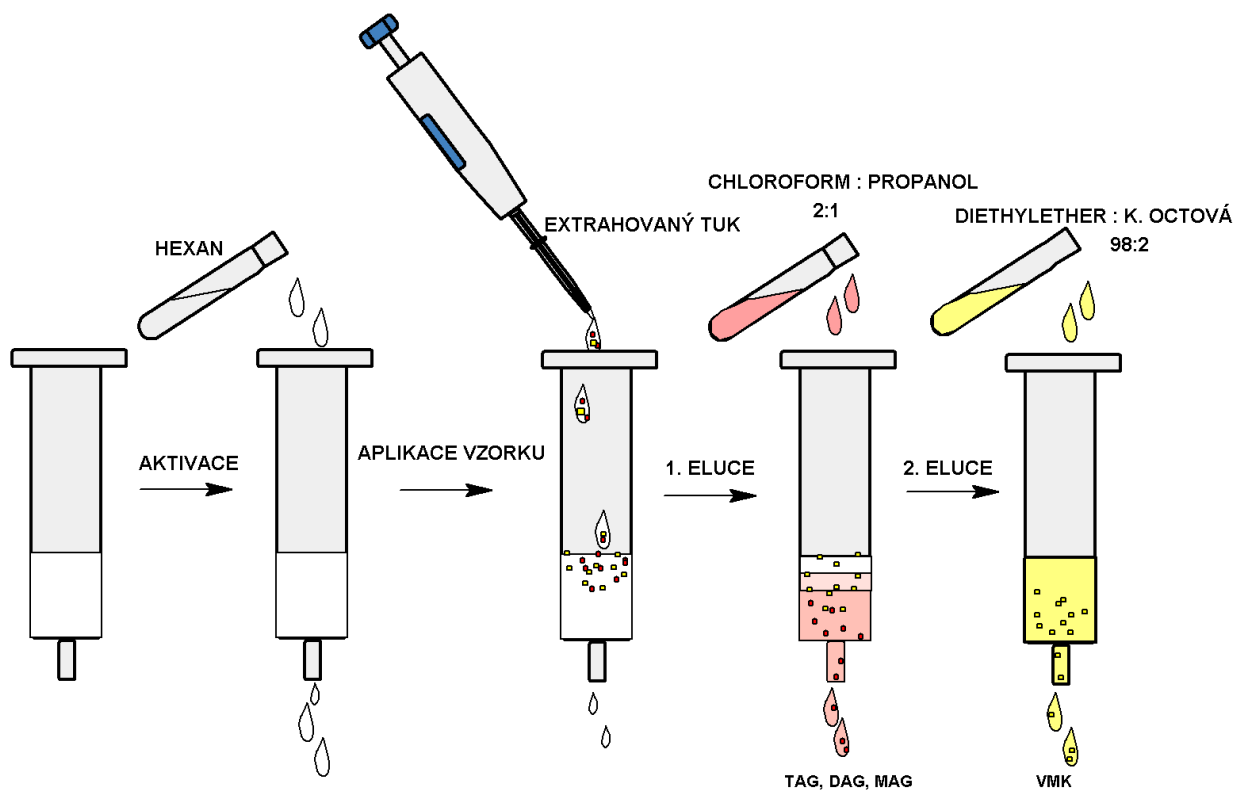
Na základě postupu podle Kaluzny a kol. [44] byl lipidický extrakt (kap. 3.3.1) podroben frakcionaci metodou SPE. Pomocí vodní vývěvy byl vytvořen podtlak v SPE manifoldu, do kterého byla připevněna separační kolonka s NH_2 sorbentem. (obr. 8) Sorbent byl aktivován 3 ml hexanu a průtok činidla kolonkou byl vždy regulován na 1 - 2 kapky za sekundu, což je podle dostupných zdrojů ideální průtok pro SPE [67]. Po kondicionování kolonky hexanem byl dávkován vzorek lipidů v 1 ml téhož rozpouštědla. Eluce první frakce, obsahující neutrální lipidy, byla realizována směsí chloroform : propanol 2:1 (v/v). Následným proplachem pomocí 2 % (v/v) roztoku kyseliny octové v diethyletheru byly eluovány FFA. Pro sběr eluátu byla vždy zvolena nádobka podle požadavků následného analytického záměru. Součástí optimalizačních experimentů byla také volba podmínek odpaření eluentu ze získaných frakcí lipidů. Vybavení pro separaci a proces frakcionace lipidů znázorňují obrázky 9 a 10.



Obrázek 8 – Separace na SPE kolonce



Obrázek 9 – Zařízení pro SPE

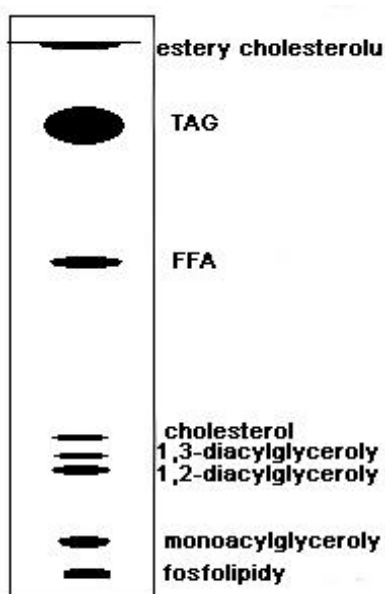


Obrázek 10 – Schéma metody frakcionace lipidů pomocí SPE

3.3.3 Frakcionace lipidů metodou TLC

Metoda tenkovrstvé chromatografie byla převzata z práce Christie [33], optimalizována v rámci bakalářské práce Popa [68] a následně použita pro ověření složení frakcí, získaných metodou SPE.

TLC destička byla aktivována vysušením při 100 °C, vzorek byl nanesen na startovní čáru a umístěn do vyvíjecí komory se směsí hexan : diethylether : k.octová 80:20:1 (v/v/v), dokud mobilní fáze nedosahovala 1 cm pod okraj destičky. Po ukončení vyvíjení byl chromatogram vysušen a umístěn do komory s jodovými parami, které vizualizují chromatografické skvrny, jejichž poloha, plocha a intenzita zbarvení charakterizují lipidické složky SPE eluátu. Schématickou separaci lipidů pomocí uvedené metody uvádí obr. 11.



Obrázek 11 – Schéma separace lipidů pomocí TLC (upraveno podle [33])

3.3.4 Esterifikace mastných kyselin

V rámci experimentů byly pro esterifikaci FA použity tři různé metody na bázi normy ČSN EN ISO 12966-2 [34]. Tato norma nahrazuje původní normu ČSN EN ISO 5509, citovanou v práci Pruknerové [69]. [70]

3.3.4.1 Esterifikace v bazickém prostředí

Pro bazickou esterifikaci bylo podle následujícího postupu připraveno 20 ml methanického roztoku KOH o koncentraci 2 mol·l⁻¹, který byl pro další použití uchováván v lednici.

$$M(\text{KOH}) = 56 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$V = 0,02 \text{ l}$$

$$c = 2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$m = c \cdot V \cdot M = 2 \cdot 56 \cdot 0,02$$

$$m = \underline{\underline{2,24 \text{ g KOH}}}$$

Vypočtené množství KOH bylo rozpuštěno ve 20 ml methanolu.

Frakce lipidů (SPE eluát) po odpaření rozpouštědla (kap. 3.3.2) byla ve vialkách s pryžovou zátkou smíchána s 5 ml isooktanu a 0,5 ml methanolického roztoku KOH ($c = 2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Po 8 minutách protřepávání byla směs ponechána 6 minut v klidu. Po oddělení fází byl z horní isooktanové vrstvy odebrán do vialky 1 ml pro GC stanovení.

3.3.4.2 Esterifikace za podmínek kyselé katalýzy

Pro kyselou esterifikaci byl na každý experiment nově připraven methanolický roztok chlorovodíku o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ podle následujícího postupu. Pro esterifikaci jedné frakce po odpaření rozpouštědla bylo potřeba připravit 7 ml tohoto roztoku.

$$w(\text{HCl}) = 35 \%$$

$$M(\text{HCl}) = 36,46 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$V = 0,007 \text{ l}$$

$$c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$\rho_{(\text{HCl } 35 \%) } = 1,1789 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3} = 1178,9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$$

Přepočet procentuální koncentrace na molární:

$$c_1 = \frac{m_A}{M \cdot V} = \frac{w \cdot m}{M \cdot V} = \frac{w \cdot \rho \cdot V}{M \cdot V} = \frac{w \cdot \rho}{M}$$

$$c_1 = \frac{0,35 \cdot 1178,9}{36,46} = 11,32 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

Potřebný objem kyseliny pro přípravu 1 M roztoku:

$$c_1 \cdot V_1 = c \cdot V$$

$$V_1 = \frac{c \cdot V}{c_1} = \frac{1 \cdot 0,007}{11,32}$$

$$V_1 = 6,18 \cdot 10^{-4} = \underline{\underline{0,62 \text{ ml HCl}_{(35 \%)}}}$$

Vypočtené množství HCl bylo doplněno methanolem do objemu 7 ml.

K frakci lipidů (SPE eluátu) po odpaření rozpouštědla bylo v destilační baňce přidáno 7 ml methanolického roztoku HCl ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a varný kamínek. Směs byla refluxována v topném hnízdě pod zpětným chladičem po dobu 10 minut. Po ochlazení baňky tekoucí vodou bylo přidáno 12,5 ml vody a obsah byl převeden do dělicí nálevky se 4 ml heptanu. Po protřepání a oddělení heptanové vrstvy byla vodná fáze znovu extrahována 4 ml heptanu. Spojené organické extrakty byly promývány vždy 5 ml vody do úplného odstranění kyselin, které bylo indikováno roztokem methylované. V průběhu experimentů byl počet promytí optimalizován na 4. (obr. 12) Dále byl roztok vysušen bezvodým síranem sodným a po přefiltrování do odměrné baňky na 10 ml doplněn heptanem po rysku. Z takto připraveného roztoku byly odebrány 2 ml do vialky s plynotěsným septem pro GC stanovení.



Obrázek 12 – Indikace odkyselení heptanových extraktů

3.3.4.3 Esterifikace za katalýzy bortrifluoridem

Methanolický roztok BF_3 je komerčně dostupný v různých koncentracích a kvůli zdravotním rizikům není doporučeno jej běžně laboratorně připravovat. Za účelem zmýdelnění (tvorby solí) vázaných FA byl rozpuštěním 2 g NaOH ve 100 ml methanolu připraven methanolický roztok hydroxidu sodného o přibližné koncentraci $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Po odpaření rozpouštědla byly k frakci lipidů (SPE eluátu) v destilační baňce přidány 4 ml tohoto roztoku spolu s varným kamínkem. Obsah baňky byl za občasného promíchání refluxován pod zpětným chladičem 10 minut. Při vyšším obsahu TAG ve vzorku se průběh saponifikace projeví vymizením viditelných kapiček tuku. Přes horní konec chladiče bylo přidáno 5 ml methanolického roztoku BF_3 a po 3 minutách varu ještě 3 ml isooktanu. Po přerušení zahřívání a odstranění chladiče bylo přidáno 20 ml nasyceného roztoku NaCl, který vyčistí organickou fází od anorganických nečistot a napomáhá ustavit fázové rozhraní. Baňka byla uzavřena a obsah byl silně protřepán (15 sekund). Dále byl roztok v baňce doplněn roztokem chloridu sodného tak, aby kapalina vystoupala do zúženého hrdla baňky a nechaly se oddělit dvě fáze. Asi 2 ml horní isooktanové vrstvy byly odebrány do vialky s pryžovým septem a případné stopy vlhkosti byly odstraněny bezvodým síranem sodným. Roztok zbavený vody byl dávkován do vialky s plynotěsným septem pro GC stanovení.

3.3.5 Podmínky metody pro stanovení methylesterů mastných kyselin

- Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Itálie)
- Autosampler AI/AS 3000
- Kapilární kolona: DB-23 o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm
- Oven – teplotní program
 - 60 °C 10 min
 - Vzestupný gradient 12 °C·min⁻¹ do 200 °C s výdrží 10 min
 - Vzestupný gradient 5 °C·min⁻¹ do 220 °C s výdrží 15 min
 - Vzestupný gradient 10 °C·min⁻¹ do 240 °C s výdrží 10 min
 - Celková doba analýzy: 62,67 min
- Inlet
 - Teplota injektoru: 250 °C
 - Splitless time: 5 min
 - Dávkování: autosampler bez děliče toku (splitless) (1 μl)
- Carrier
 - Průtok dusíku: 0,5 ml·min⁻¹
- Detektor FID (Plamenově ionizační)
 - Teplota detektoru: 250 °C
 - Průtok vzduchu: 350 ml·min⁻¹

- Průtok vodíku: 35 ml·min⁻¹
- Make-up dusíku: 30 ml·min⁻¹

3.3.6 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin

Mastné kyseliny v rámci všech experimentů byly stanoveny po převedení na methylestery. Identifikace byla provedena na základě srovnání retenčních časů, kvantifikace výpočtem z ploch píků identických standardů. Tabulka 4 uvádí směs standardů FFA použitých pro identifikaci a kvantifikaci FA ve vlastních stanoveních.

Tabulka 4 – Přehled standardů použitých k identifikaci a kvantifikaci mastných kyselin

Mastná kyselina	Retenční čas (min)	Koncentrace (mg·ml ⁻¹)	Plocha píku (mV·s)
máselná	13,39	0,04	367958
kapronová	18,28	0,04	2825843
kaprylová	21,68	0,04	3466573
kaprinová	24,15	0,04	3824882
undekanová	25,26	0,02	2083691
laurová	26,39	0,04	4363197
tridekanová	27,59	0,02	2160471
myristová	28,99	0,04	5142349
myristolejová	29,72	0,02	2165183
pentadekanová	30,61	0,02	2198462
cis-10-pentadecenová	31,55	0,02	2002343
palmitová	32,63	0,06	11862097
palmitolejová	33,35	0,02	2204918
heptadekanová	34,61	0,02	1951607
cis-10-heptadecenová	35,41	0,02	1855260
stearová	36,79	0,04	6146507
elaidová	37,20	0,02	2123704
olejová	37,56	0,04	12419087
linolelaidová	38,04	0,02	1732572
linolová	38,86	0,02	5671779
γ-linolenová	39,69	0,04	1789686
α-linolenová	40,60	0,02	1986463
arachová	42,02	0,02	3477495
cis-11-eicosenová	43,03	0,02	2041954
cis-11,14-eicosadienová	44,97	0,02	1641102
heneicosanová	45,38	0,02	1676667
cis-8,11,14-eicosatrienová	46,24	0,04	1632369
arachidonová	47,10	0,02	1269034
cis-11,14,17-eicosatrienová	47,58	0,02	1405360
cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenová	49,54	0,02	3310808
behenová	50,04	0,02	1303750
eruková	51,03	0,02	1683480
cis-13,16-docosadienová	53,00	0,02	1489194
trikosanová	53,26	0,04	1614542
lignocerová	56,70	0,02	3029313
cis-4,7,10,13,16,19-docosaheptaenová	57,97	0,02	1501724
nervonová	58,31	0,02	867969

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato práce je součástí projektu řešeného v rámci Ústavu chemie potravin a biotechnologií, který se zabývá problematikou lipidů v přírodních, resp. tavených sýrech a jejich změnami během výroby, zrání a skladování.

Vzhledem k výše zmíněné důležitosti FFA v chuti a vůni sýrů následující podkapitoly shrnují experimenty, provedené za účelem optimalizace metody SPE, jakožto prostředku k získání frakce FFA ze sýrové matrice pro její následnou analýzu. Prvotní pokusy s tukovými extrakty taveného sýru (kap. 3.3.1) poukázaly na přílišnou komplexnost lipidů sýru, vzhledem k úzce vymezenému záměru výzkumu. Tato skutečnost vedla k prozatímnímu zjednodušení výchozího vzorku, a za účelem přesnějšího vyhodnocení, snazší kvantifikace a omezení případných interferencí byly proto v této fázi výzkumu použity vzorky standardů FFA a slunečnicový olej. Další výhodou byla vzniklá časová úleva, neboť extrakce lipidů ze sýrové matrice je poněkud zdlouhavá.

Veškeré experimenty v rámci této práce byly provedeny s použitím výše zmíněných postupů. Pro frakcionaci lipidů byla použita SPE, jejíž optimalizace je hlavní náplní této práce; čistota frakcí byla ověřena pomocí TLC. Pro esterifikaci FA v získaných frakcích byla použita metoda využívající metanolický roztok bortrifluoridu [34] a pro stanovení FA ve všech získaných frakcích byla použita GC s FID detekcí.

Výsledky se týkají především základních poznatků pro použití SPE, jako jsou objemy elučních činidel, vhodné dávkování vzorku, podmínky odpaření rozpouštědel z jednotlivých frakcí a skladování extraktů. Součástí diskuse jsou také možnosti přípravy methylesterů pro GC stanovení. Rozsáhlejší závěry ohledně opakovatelnosti metody uvádí ve své práci Sýkora [58]

4.1 Optimalizace podmínek SPE

Vybrané parametry byly optimalizovány za účelem zisku maximálního výtěžku FFA. Z výše zmíněného důvodu byly pokusy s lipidickými extrakty sýru prozatím odloženy a parametry byly testovány jednak pomocí standardů FA, a dále na vzorku slunečnicového oleje. Výsledky byly nejprve kontrolovány jednoduchým vysušením a zvážením frakcí, jímaných po aplikaci vzorku na SPE kolonu. Takto získané výsledky sice nebyly příliš přesné (bylo poměrně obtížné odpařit frakce skutečně do sucha), nicméně nám poskytly první cenné informace a naznačily další směr optimalizace postupu.

Pro náš účel byly na základě studie Kaluzny a kol. [44], doporučení výrobce, a s přihlédnutím k předpokládané koncentraci lipidů v sýrech zvoleny aminopropylové SPE kolony o objemu 3 ml s 500 mg sorbentu.

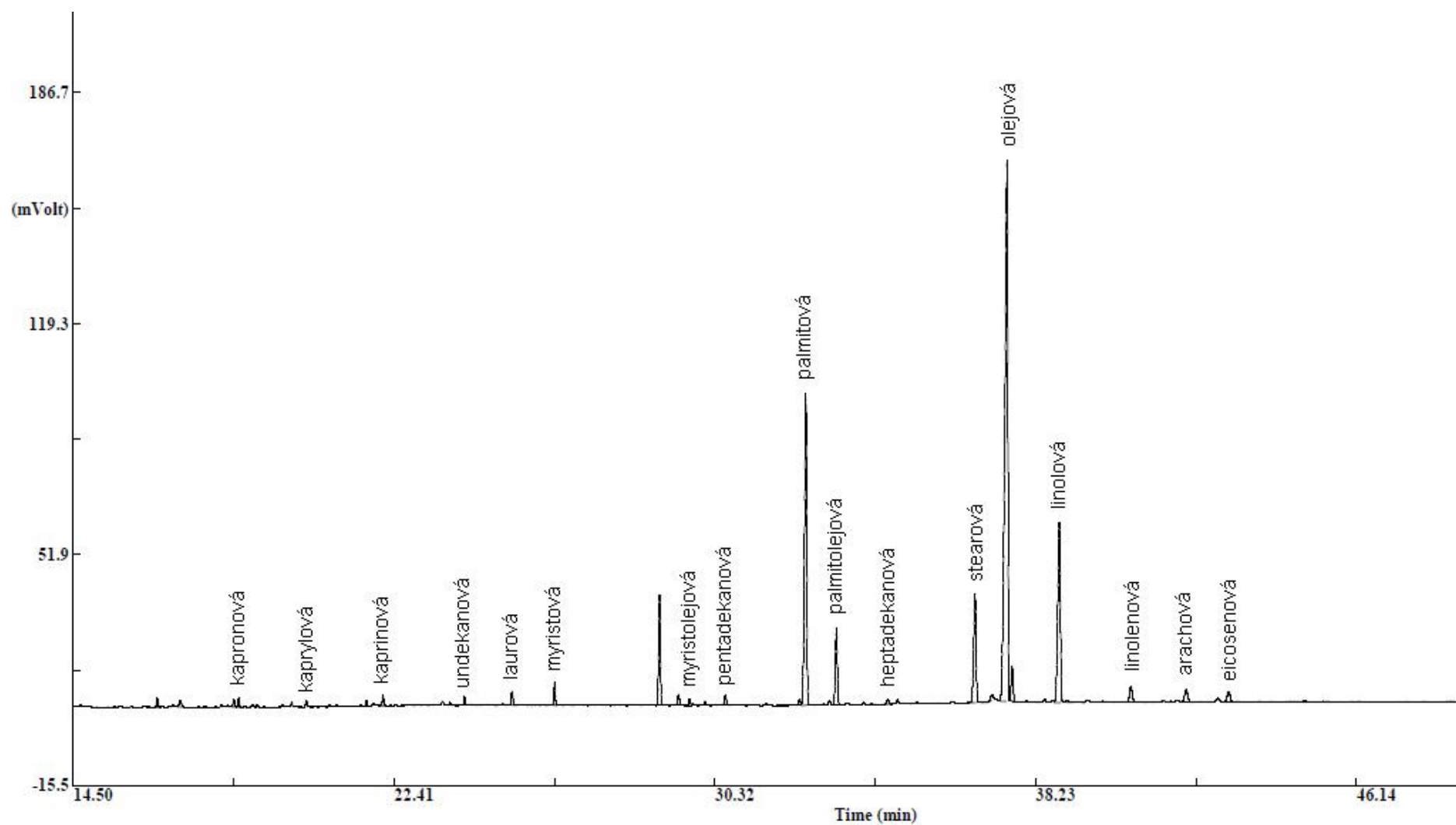
4.1.1 Optimalizace objemů rozpouštědel

Proces eluce jednotlivých frakcí, popsáný v kap. 3.3.2, zahrnuje po nasorbování vzorku proplach kolony vhodným elučním činidlem. Byla připravena potřebná rozpouštědla v souladu s postupem Kaluzny a kol. [44], podle něhož by měly být roztokem chloroformu a propanolu 2:1 (dále rozpouštědlo A) eluovány všechny neutrální lipidy (cholesterol a jeho estery, MAG, DAG, TAG). První frakce je v rámci této práce také označena jako frakce TAG 1, protože TAG jsou zde zastoupeny ve velkém přebytku. Následně byla aplikací nižšího objemu téhož rozpouštědla jímána druhá, tzv. kontrolní frakce (TAG 2), pomocí které mělo být ověřeno, jestli objem rozpouštědla pro první frakci byl dostatečný k desorpci všech neutrálních lipidů ze vzorku. Po eluci neutrálních lipidů by na aminopropylové fázi původní kolony měly zůstat zachyceny polární lipidy – FFA a PL. Použitím 2 % roztoku kyseliny octové v diethyletheru (rozpouštědlo B) byla eluována frakce FFA (FFA 1) a dostatečné

množství rozpouštědla pro kvantitativní eluci všech FFA bylo opět ověřeno jímáním kontrolní čtvrté frakce (FFA 2). (obr. 10)

4.1.2 Eluce frakce neutrálních lipidů

Pro získání frakce FFA 1, která by neobsahovala žádné jiné interferující lipidické složky, bylo shledáno jako žádoucí zbavit nejprve kolonku nasorbovaných neutrálních lipidů. Obzvláště TAG díky absenci původních OH skupin glycerolu vykazují nejnížší afinitu k polární aminopropylové fázi a část z nich prochází kolonkou s minimální retencí. [43] [61] Tvzení, že část neutrálních lipidů proniká bez zadržení, bylo podpořeno experimentem, kdy byla jímána frakce vzorku v hexanu po průchodu kolonkou bez použití jakéhokoliv elučního činidla. Tzv. nultá frakce byla analyzována pomocí GC (Graf 1). Z uvedených důvodů byla vyvinuta snaha o nalezení takového množství rozpouštědla A, které by bezpečně vyplavilo z kolonky všechny neutrální lipidy do frakce TAG 1, a zároveň by bylo reálné tento objem v únosném časovém rozmezí zcela odpařit. Nižší množství rozpouštědla také zkracuje dobu analýzy a v neposlední řadě šetří životní prostředí. Souhrn výsledků uvádí Tabulka 5.



Graf 1 – Chromatogram průniku TAG bez použití elučního činidla

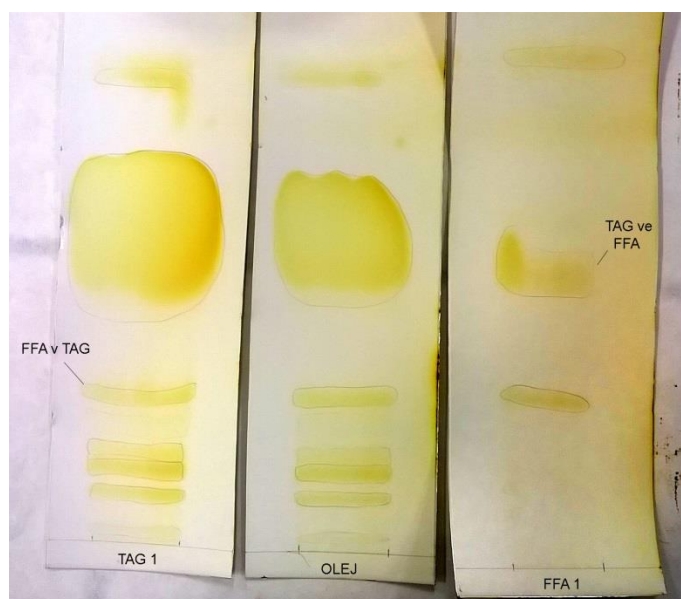
Tabulka 5 – Optimalizace objemu rozpouštědla A pro eluci 1. frakce (TAG 1)

Vzorek	frakce 1		frakce 2			TAG ve frakci FFA	
	rozpuštědlo A (ml)	výtěžek (mg)	rozpuštědlo A (ml)	kontrola vážením (mg)	kontrola na GC (μg)	kontrola TLC (přítomnost skvrn)	kontrola na GC (μg)
46,3	5	42,4	5	0	ns	ns	ns
20,1	5	37,6	5	0	ns	ns	ns
10,1	5	10,8	5	0	ns	ano	ns
5,2	5	4,7	5	0	ns	ano	ns
10,8	7	16,1	3	0	ns	ns	ns
11,2	7	9,4	2	0	ns	ano	ns
10,3	7	7,2	3	0	ns	ns	ns
10	7	9,0	2	0	15,8	ano	84,3

ns - nebylo stanoveno

Vzhledem k tomu, že v citovaných pracích se objemy rozpouštědel pro první eluci různí (v rozsahu 4 – 10 ml), bylo na základě prací Kaluzny a kol. [44], Agren a kol. [63] a Flurkey [64] zvoleno výchozí množství rozpouštědla A jako 5 ml. Pro rychlou kontrolu bez nutnosti esterifikace a zdlouhavé GC analýzy byly výtěžky z počátku stanovovány pouze vážením eluátu po odpaření rozpouštědla. Směs chloroformu a propanolu vykazovala nízkou těkavost. V rámci optimalizačních experimentů bylo proto nutné také nalézt vhodné postupy odpařování elučních činidel. Použití rotační vakuové odparky se ukázalo být méně účinné, než odpařování pomocí SPE manifoldu, a zároveň byl sledován čas potřebný k odpaření do konstantní hmotnosti. Z důvodů hledání vhodného způsobu evaporace byly některé frakce odpařeny nedostatečně, a proto jsou hodnoty výtěžků pouze orientační.

Souběžně byla v rámci bakalářské práce Popa [68] optimalizována také metoda tenkovrstvé chromatografie pro ověření složení jednotlivých frakcí. Po optimalizaci metody TLC bylo možno začít ověřovat také případné znečištění frakcí, a na základě pozitivního nálezu acylglycerolů ve frakci FFA bylo navýšeno množství rozpouštědla A na 7 ml. Použití TLC pro ověření SPE frakcí znázorňuje obr. 13.



Obrázek 13 – Ověřování frakcí pomocí TLC

Experimenty zabývající se optimalizací a ověřováním frakcí po SPE zpracovává ve své práci Pop [68].

Objem 7 ml eluátu byl odpařen a orientačním vážením výtěžku kontrolní druhé frakce nebyla detekována přítomnost lipidů. Pomocí GC však v kontrolní frakci TAG 2 bylo zjištěno malé procento lipidů, a kontrola TLC potvrdila také průnik TAG do frakce FFA 1, která byla eluována následně. Řešením by mohlo být další zvyšování objemu rozpouštědla A, případně (při zachování stávajících experimentálních podmínek) nepatrný zásah do složení elučních roztoků. Kaluzny a kol. [44] totiž deklarují, že eluční činidla je nutno připravovat s velkou přesností, poněvadž i nepatrná změna pH nebo polarity může mít zásadní vliv na veškeré interakce a desorpční procesy na aminopropylkové fázi. Výsledky eluce tedy mohou být výrazně ovlivněny nevhodnými podmínkami experimentů, které neprobíhaly v inertním prostředí, a proto docházelo během procesu extrakce i přípravy činidel k vyprchávání těkavých komponent, a tím ke změnám ve složení elučních roztoků.

4.1.3 Eluce frakce volných mastných kyselin

První uvedené pokusy byly pro jednoduchost a lepší názornost provedeny s navážkami standardů FFA. Vždy byla navážena směs několika nejběžnějších FFA odlišné molekulové hmotnosti (délky uhlíkatého skeletu), chemické povahy (dvojně vazby) a s nimi spojené chromatografické retence. Postupným snižováním rozpouštědla B byl vážením frakcí nalezen teoretický optimální objem 7 ml, kterým bylo možno vyplavit z kolonky kompletní navážku FFA a zároveň nebylo obtížné jej z eluátu odpařit.

Následně byly frakcionaci podrobovány vzorky slunečnicového oleje. Vážením kontrolní frakce FFA 2 bylo zjištěno, že objem 6 ml elučního roztoku B je již nedostatečný pro eluci všech FFA ve frakci FFA1. Jako optimální byl tedy zvolen objem 7 ml. Frakce FFA 2 byla po eluci 7 ml činidla, odpaření a zvážení prázdná, avšak pomocí GC bylo prokázáno malé množství lipidů v řádu desítek mikrogramů. V optimalizaci je tedy třeba pokračovat, stejně jako v případě předchozí kapitoly, případně by bylo dobré zvážit použití inertního plynu (např. dusíková atmosféra), které je více diskutováno v kap. 4.4. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 6 a 7.

Tabulka 6 – Optimalizace objemu rozpouštědla B pro eluci standardů FFA

vzorek	frakce 3		frakce 4	
navážka standardů FFA (mg)	rozpouštědlo B (ml)	výtěžek (mg)	rozpouštědlo B (ml)	kontrola vážením (mg)
44,7	10	43,1	3	0
30,7	10	32,7	3	0
16,1	10	18,0	3	0
37,4	8	38,2	3	0
35,9	7	36,3	3	0

Tabulka 7 – Optimalizace objemu rozpouštědla B pro eluci FFA ze vzorku oleje

Vzorek	frakce 3		frakce 4		
navážka tuku (mg)	rozpouštědlo B (ml)	výtěžek (mg)	rozpouštědlo B (ml)	kontrola vážením (mg)	kontrola na GC (μg)
20,1	8	2,4	2	0	ns
10,1	7	1,1	2	0	ns
10,8	6	3,4	2	1,2	ns
10,3	6	6,8	2	2	ns
11,2	7	3,0	2	0	ns
10	7	0,2	2	0	27,36
5,2	7	0,4	2	0	ns

ns - nebylo stanoveno

4.2 Sorpční kapacita kolonky

Pro zjednodušení byla nejprve sorpční kapacita testována na vybraných standardech FA, potom byl tentýž postup použit se vzorky oleje. Vybrané výsledky (viz tab. 8) jsou vyjádřeny jako hmotnost příslušných frakcí buď po vysušení a zvážení, nebo po esterifikaci výpočtem pomocí ploch píků. Čistota frakcí byla kontrolována pomocí TLC.

Výrobce uvádí, že množství analytu by nemělo být větší než 5% hmotnosti sorbentu v kolonce. Při použití kolonky s 500 mg sorbentu tedy lze očekávat kapacitu cca 25 mg analytu.

Christie [33] ve své publikaci uvádí, že pro mléčný tuk je reálné zachovat výtěžnost při dávkování do 10 mg vzorku lipidů. Při vyšší navážce již pravděpodobně bude docházet k přetížení kolonky a průniku. Velmi rozsáhle se tomuto tématu věnovali Pernet a kol. [71], kteří sledovali sorpční kapacitu tří typů sorbentů pro tři velikosti kolon, na kterých pozorovali výtěžnost jedenácti obdržených frakcí neutrálních a polárních lipidů. Na základě těchto prací a doporučení výrobců kolonek bylo zvoleno počáteční množství směsi standardů, a při postupném zvyšování navážky byl vážením eluátu zaznamenán průnik lipidů do kontrolní frakce při navážce nad 40 mg.

Při pokusu o stanovení stejné navážky oleje bylo pomocí TLC zjištěno, že k průniku dochází již při mnohem nižší navážce a část FFA tak byla detekována již v první frakci (11,7 μg). Toto zjištění lze vysvětlit tak, že další zachycené složky oleje způsobují zmenšení sorpčního povrchu, který může být využit pro zachycení FFA. Pomocí TLC byla rovněž zjištěna (a na GC kvantifikována) TAG kontaminace ve frakci FFA 1 (84,3 μg). Řešení této problematiky bylo již naznačeno v předešlých kapitolách.

Výtěžek frakcí FFA i TAG byl stanoven na GC a skrze koncentrace a plochy píků standardů byla přepočtena výtěžnost s výsledkem 7,6 % TAG a 40,7 % FFA, vzhledem k hmotnostnímu výtěžku extrakce. Tato čísla vypovídají o velkých ztrátách v průběhu manipulace po extrakci, tzn. během procesu odpařování rozpouštědla a esterifikace. Tyto ztráty a jejich řešení jsou diskutovány v kap. 4.4. Pro definitivní určení maximální kapacity kolonky budou ještě provedeny další ověřující experimenty.

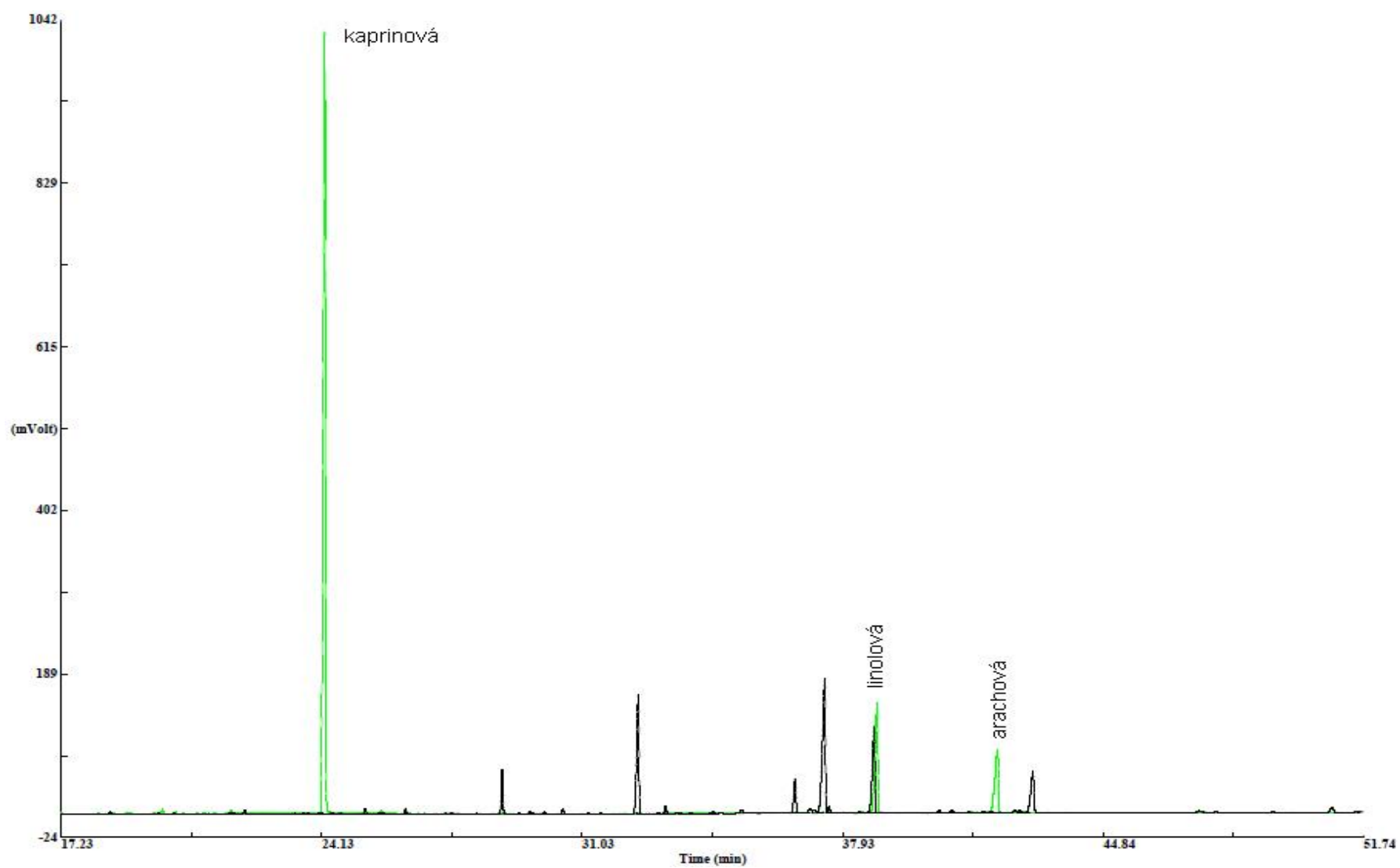
Tabulka 8 – Optimalizace navážky vzorku lipidů pro frakcionaci

vzorek	hmotnost frakce (mg)		kontrola pomocí TLC		kontrola pomocí GC (μg)	
navážka tuku (mg)	TAG (frakce 1)	FFA (frakce 3)	FFA ve frakci TAG	TAG ve frakci FFA	FFA ve frakci TAG	TAG ve frakci FFA
46,29	42,4	2,6	ns	ns	ns	ns
11,2	9,4	3	ano	ano	ns	ns
10,8	16,1	3,4	ns	ns	ns	ns
10,3	7,2	6,8	ns	ns	ns	ns
10	9	0,2	ns	ns	11,7	84,3
10,1	10,8	1,1	ano	ano	ns	ns
5,2	4,7	0,4	ano	ano	ns	ns

ns - nebylo stanoveno

4.3 Kvantifikace metodou rozdílných esterifikačních podmínek

V kapitole 2.3.1 byly stručně shrnuty poznatky o průběhu kysele a bazicky katalyzované esterifikace FA. Na základě těchto poznatků byl proveden experiment se směsí standardů tří mastných kyselin, při kterém byl týž vzorek FA esterifikován za podmínek alternativní kyselé (kap. 3.3.4.2) a bazické (kap. 3.3.4.1) katalýzy. Podle informací uvedených v literatuře (kap. 2.3.1) by mělo za podmínek kyselé esterifikace dojít k esterifikaci FFA a zároveň transesterifikaci FA vázaných v TAG. Naproti tomu bazicky katalyzovaná reakce má za následek zmýdelnění vázaných FFA a esterifikaci pouze vázaných FA. Při stanovení vzniklých methylesterů na GC by proto rozdíl celkové plochy píků pro kyselou a bazickou esterifikaci měl odpovídat obsahu FFA. Experimentem se standardy FA mělo být nejprve prokázáno, že esterifikace za účasti báze na FFA nepůsobí. Graf 2 znázorňuje výsledný chromatogram.

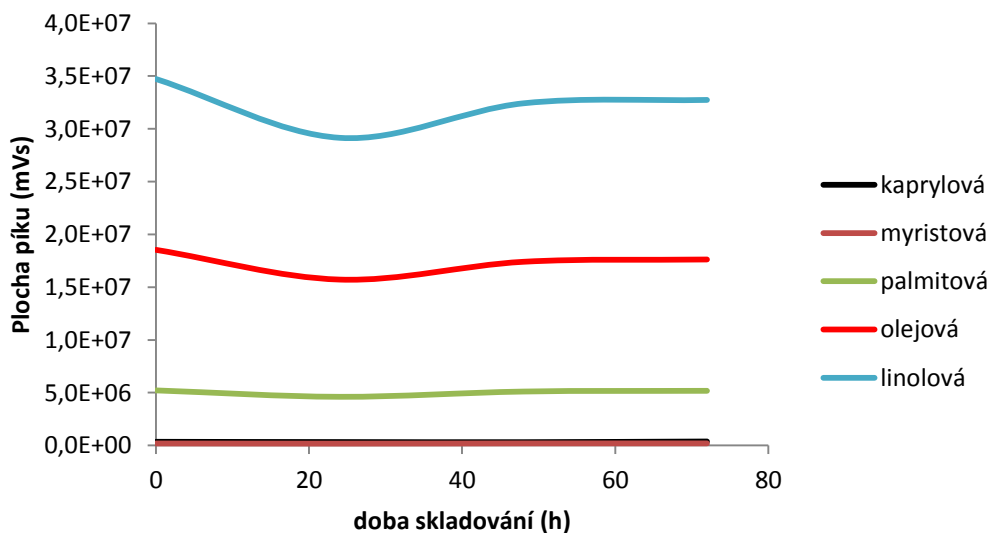


Graf 2 – Srovnání kyselé (zelená) a bazické (černá) esterifikace

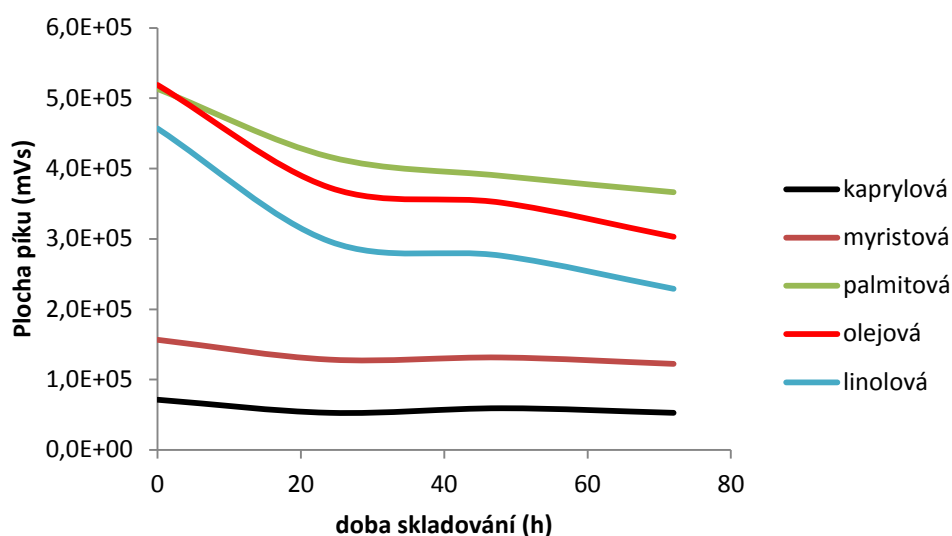
Zeleně značené píky představují kyselou esterifikaci, a podle retenčních časů standardů byly identifikovány kyseliny kaprinová, linolová a arachová, které byly součástí esterifikované směsi. Černé píky znázorňují stanovení bazicky katalyzovaného vzorku. V alkalických podmínkách dochází pravděpodobně k reakcím na dvojných vazbách kyseliny linolové a k fragmentaci víceuhlíkatých FA na nižší celky, což má za následek četné interference, díky kterým nelze metodu rozdílných esterifikačních podmínek pro kvantifikaci použít. Norma ČSN EN ISO 12966-2 také uvádí, že kvůli prevenci vzniku falešných píků je vhodné zařadit krok odstranění nezmýdelnitelných látek, které však v případě tohoto pokusu odstraněny nebyly. Sýkora [58] ve své práci srovnává uvedené esterifikační metody z hlediska jednoduchosti a rychlosti provedení, výtěžnosti, dostupnosti a bezpečnosti chemikálií. Na základě výše uvedených výsledků a závěrů Sýkory [58] byla pro všechny další experimenty použita esterifikace za katalýzy BF_3 .

4.4 Experimentální podmínky, trvanlivost a uchovávání extraktů

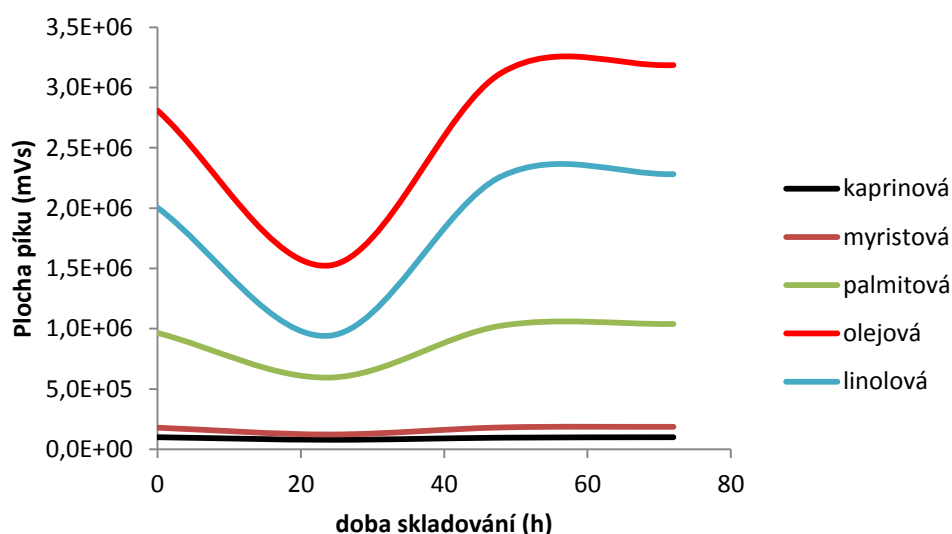
Vzhledem k časové náročnosti přípravy extraktů i následné GC analýzy nebylo někdy možné analyzovat všechny SPE frakce tentýž den. Z tohoto důvodu musely být připravené methylestery FA ve vialkách s plynotěsným septem uchovány delší dobu do okamžiku stanovení na GC. Pro ověření případných změn obsahu methylesterů během skladování byly tři vybrané extrakty skladovány po dobu 3 dny v lednici ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), v mrazničce ($-17\text{ }^{\circ}\text{C}$) a při laboratorní teplotě ($23\text{ }^{\circ}\text{C}$). Extrakty byly analyzovány v intervalech 24 hodin a byla sledována koncentrační tendence methylesterů v závislosti na čase. Výsledky experimentu jsou uvedeny v grafech 3, 4 a 5.



Graf 3 – Skladovatelnost extraktů (v lednici při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$)



Graf 4 – Skladovatelnost extraktů (v mrazničce při teplotě -17 °C)



Graf 5 – Skladovatelnost extraktů (při teplotě laboratoře 23 °C)

Bylo zvoleno pět různých methylesterů FFA a do grafů byla vynesena závislost plochy píku na délce uchovávání esterifikovaného vzorku. Z uvedených výsledků vyplývá, že delší skladování ohrožuje nenasycené FFA více, než kyseliny bez dvojných vazeb. Výsledky zároveň ukazují, že nejnižší riziko ztráty výtěžku obnáší skladování vzorku při teplotě lednice, proto byl pro případ nutnosti odkladu GC analýzy zvolen tento způsob uchování a extrakty byly zpracovány nejpozději do druhého dne. Nejvýraznějšími změnami prochází analyzovaná směs při teplotě laboratoře. Nárazové zvýšení koncentrace esterů po dvou dnech skladování lze připsat snížené těsnosti septa vialky při vyšší teplotě, čímž dochází k vyprchávání rozpouštědla a zakoncentrování vzorku.

Jak již bylo zmíněno v kap. 4.2, i za podmínek bezprostřední GC analýzy byly zjištěny značné ztráty. Zejména methylestery FFA s krátkým řetězcem, které jsou charakteristické pro mléčný tuk, jsou velmi náchylné ke ztrátám hned v několika fázích experimentálního postupu. Estery nízkouhlíkatých FFA se například mohou díky své vysoké těkavosti ztrácet při průchodu esterifikačního média zpětným chladičem. K dalším ztrátám může dojít v rámci extrakce vodné fáze díky vyšší rozpustnosti nízkouhlíkatých methylesterů ve vodě. Methylestery mohou také ze směsi vyprchat při odpařování extrakčního rozpouštědla, nebo v kroku přečištění na TLC, pokud se jedná o stanovení vyškrábaných TLC skvrn. [72] Kvůli vysoké těkavosti FFA i jejich esterů jsou všechny experimenty citované v teoretické části prováděny v inertní atmosféře, nejčastěji v atmosféře N_2 . Zavedením dusíkové atmosféry bychom mohli pro další experimenty jednak předejít ztrátám na výtěžku těkáním FFA, ale také zamezit změnám ve složení těkavých elučních směsí, což by mohlo mít za následek významné vylepšení dosažené separační účinnosti a omezení kontaminace jednotlivých lipidických frakcí, jak již bylo zmíněno v kapitolách 4.1.2, 4.1.3 a 4.2

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá nalezením optimálních podmínek a postupů pro použití extrakce tuhou fází k frakcionaci lipidů sýru, se zaměřením na získání frakce volných mastných kyselin. Vzhledem k tomu, že tato práce stojí teprve na počátku rozsáhlejšího výzkumu, prozatímní experimenty byly pro názornost a snazší vyhodnocení provedeny se vzorky standardů volných mastných kyselin a vzorkem slunečnicového oleje. Po úspěšné optimalizaci pro jednodušší vzorek bude moci být přikročeno k vyladování metody pro extrakt ze syrové matrice, který byl na základě prvotních experimentů shledán jako příliš komplexní pro první stádium optimalizace.

Na podkladě experimentů se podařilo pro dané podmínky nalézt optimální množství extrakčních činidel pro eluci volných mastných kyselin (7 ml 2 % roztoku kyseliny octové v diethyletheru) i frakce neutrálních lipidů (7 ml roztoku chloroform : propanol v poměru 2:1). Vhodné dávkování vzorku pro extrakci dosud nebylo uspokojivě podloženo a bude součástí navazujících optimalizačních experimentů. V průběhu výzkumu byla paralelně v rámci bakalářské práce Popa [68] optimalizována metoda tenkovrstvé chromatografie pro ověřování složení frakcí, jejíž zařazení přinese značné urychlení procesu optimalizace množství aplikovaného vzorku.

V rámci orientační kvantifikace procesu extrakce byl učiněn pokus o stanovení výtěžnosti na základě rozdílných esterifikačních podmínek. Tato metoda se ukázala být nevhodná pro daný účel díky kompetenčním reakcím mastných kyselin v bazickém prostředí, a nebyla proto doporučena jako spolehlivý prostředek ke kvantifikaci metody.

Dále byl ověřen vliv teploty a doby uchovávání extraktu na jeho složení. Výsledky uspokojivě prokazují, že při skladování extraktu v běžných teplotách chladničky nedochází k významným změnám v obsahu esterifikovaných mastných kyselin, a je proto možné v případě potřeby stanovení na plynovém chromatografu odložit i o několik dní.

Výzkum byl zaměřen prozatím spíše na kvalitativní oddělení jednotlivých frakcí a omezení kontaminace. Výtěžnost pro dané podmínky byla stanovena pouze orientačně pomocí plynové chromatografie vzhledem k výtěžku extrahovaných frakcí ve výši 7,6 % neutrálních lipidů a 40,7 % volných mastných kyselin. Vzhledem k náchylnosti procesu k velkým ztrátám a posunu extrakční rovnováhy by rapidní přínos pro kvalitu i kvantitu extrakce pro další experimenty mohlo mít zařazení inertní atmosféry, jako prostředí pro celou laboratorní práci od přípravy elučních směsí po stanovení na plynovém chromatografu.

Mimo zmíněné cíle je pro finální optimalizaci metody potřeba dále zpracovat opakovatelnost metody, která je vyhodnocována v rámci diplomové práce Sýkory [58], a po její úspěšné validaci bude možné přistoupit k používání této metody pro stanovování volných mastných kyselin v různých typech sýrů.

6 LITERATURA

- [1] KRATOCHVÍL, L. *Výroba mléka* [online]. Ministerstvo zemědělství a výživy ČR. Praha, 1988, s. 272 [cit. 21.11.2015].
- [2] FOX, P. F. a P. L. H. MCSWEENEY *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Great Britain: Springer Science & Business Media, 1998.
- [3] MÅNSSON, Helena Lindmark. Fatty acids in bovine milk fat. *Food* [online]. 2008, **52**(0), - [cit. 2015-11-21]. DOI: 10.3402/fnr.v52i0.1821. Dostupné z: <http://www.foodandnutritionresearch.net/index.php/fnr/article/view/1821>
- [4] DRBOHLAV, Jan a Marie VODIČKOVÁ. *Tabulky látkového složení mléka a mléčných výrobků*. 1. vyd. Praha : ÚZPI, 2001.
- [5] JENNESS, Robert. BIOSYNTHESIS AND COMPOSITION OF MILK. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 1974, **63**(1), 109-118 [cit. 2015-11-21]. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12678111. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1111/1523-1747.ep12678111>
- [6] Fat globules. *Vertical Learning Labs* [online]. 2011 [cit. 2015-11-24]. Dostupné z: <http://www.verticallearning.org/curriculum/science/gr7/student/unit01/page32.html>
- [7] WALSTRA, Pieter a Robert JENNESS. *Mlékárenská encyklopedie*. New York: Wiley, 1984, s. 1545. S. 1545.
- [8] PALMQUIST, DL, AD BEAULIEU a DM BARBANO. *Feed and animal factors influencing milk fat composition* [online]. 1993 [cit. 2015-11-24]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8326036>
- [9] HILL, O.J. a L.S. PALMER A Study of the Relation of the Feed Consumed by the Cow to the Composition of Milk Fat and the Properties of Butter. *Journal of Dairy Science* [online]. 1938, **21**(9), 529-544 [cit. 2015-11-28]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(38)92998-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030238929984>
- [10] SAMKOVÁ, E. a kol. Variabilita v zastoupení významných mastných kyselin a jejich skupin v individuálních a bazénových vzorcích syrového kravského mléka. *Mlékařské listy* [online]. 2010, (119), 18-21 [cit. 2015-11-28]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/119_s._18-21.pdf
- [11] SAMKOVÁ, E. a kol. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat. *South African Journal of Animal Science* [online]. 2012, **42**(2), 83-100 [cit. 2015-11-28]. Dostupné z: <http://www.ajol.info/index.php/sajas/article/view/77759/68180>
- [12] HILLBRICK, G. a M.A. AUGUSTIN Milkfat characteristics and functionality: Opportunities for improvement. *Australian Journal of Dairy Technology* [online]. 2002, (1), 45-51 [cit. 2015-11-28]. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/199358112/fulltextPDF?accountid=17115>
- [13] RAMASWAMY, N., R.J. BAER, D.J. SCHINGOETHE, A.R. HIPPEN, K.M. KASPERSON a L.A. WHITLOCK Composition and Flavor of Milk and Butter from Cows Fed Fish Oil, Extruded Soybeans, or Their Combination. *Journal of Dairy Science* [online]. 2001, **84**(10), 2144-2151 [cit. 2015-11-28]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74659-0. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030201746590>
- [14] KAYLEGIAN, K.E. a R.C. LINDSAY *Handbook of Milkfat Fractionation Technology and Applications*. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1995.
- [15] JENSEN, R.G., A.M. FERRIS a C.J. LAMMI-KEEFE The composition of milk fat. *Journal*

- of dairy science* [online]. 1991 [cit. 2015-11-28]. Dostupné z:
[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(91\)78509-3/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(91)78509-3/pdf)
- [16] SLOTS, T., G. BUTLER, C. LEIFERT, T. KRISTENSEN, L.H. SKIBSTED a J.H. NIELSEN Potentials to differentiate milk composition by different feeding strategies. *Journal of Dairy Science* [online]. 2009, **92**(5), 2057-2066 [cit. 2015-11-28]. DOI: 10.3168/jds.2008-1392. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209705211>
- [17] CORMAN, S.A. a Daniel DALEMANS. *Method for reducing the saturated fatty acid content of milk fat, products obtained and applications thereof*. WO2009056493 A1 Patent. Uděleno 2009-05-07
- [18] WALSTRA, Pieter a Robert JENNESS. *Mlékárenská encyklopedie*. New York: Willey, 1984. S. 1551.
- [19] NAWAR, Wassef W. *Thermal Decomposition of Lipids* [online]. b.r., , 94 [cit. 2015-12-14]. DOI: 10.1021/bk-1989-0409.ch009. Dostupné z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1989-0409.ch009>
- [20] SINGH, Tanoj K., Keith R. CADWALLADER a MaryAnne DRAKE. Biochemical Processes in the Production of Flavor in Milk and Milk Products. *Handbook of Food Products Manufacturing* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2007, , 715 [cit. 2015-12-14]. DOI: 10.1002/9780470113554.ch78. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/9780470113554.ch78>
- [21] DAY, E. A. Milk lipids symposium: Autooxidation of milk lipids. *Journal of Dairy Science* [online]. 1960, (9) [cit. 2015-12-14]. Dostupné z:
http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/6298/SR%20no.%2093_OC_R.pdf;jsessionid=1F38C6FC23BA6E1FD1321E5B086DD935?sequence=1
- [22] FOX, P.F. *Advanced dairy chemistry* [online]. 3rd ed. New York, N.Y: Springer, 2003 [cit. 2015-12-14]. Dostupné z:
<https://books.google.cz/books?id=05sxUplvwSEC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [23] MIN, David B, Thomas H SMOUSE a Stephen S CHANG. *Flavor chemistry of lipid foods* [online]. Champaign, Ill.: American Oil Chemists' Society, c1989, v, 462 p. [cit. 2015-12-14].
- [24] ARDÖ, Ylva. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* [online]. 2006, **24**(2), 238-242 [cit. 2015-12-15]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.11.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975005001461>
- [25] YVON, Mireille a Liesbeth RIJNEN. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* [online]. 2001, **11**(4-7), 185-201 [cit. 2015-12-15]. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00049-8. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601000498>
- [26] WEIMER, Bart C. Improving the flavour of cheese [online]. Boca Raton: CRC Press, 2007 [cit. 2015-12-14]. ISBN 978-084-9391-583. Dostupné z:
<https://books.google.cz/books?id=97qkAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs>
- [27] BILLS, D.D., R.A. SCANLAN, R.C. LINDSAY a Lois SATHER. Free Fatty Acids and the Flavor of Dairy Products. *Journal of Dairy Science* [online]. 1969, **52**(8), 1340-1345 [cit. 2015-12-14]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(69)86749-4. Dostupné z:
[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(69\)86749-4/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(69)86749-4/pdf)
- [28] FOX, P.F. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Volume 1 General Aspects* [online]. Second edition. Boston, MA: Springer US, 1993 [cit. 2016-02-08]. Dostupné z:

https://books.google.cz/books?id=a95C5Nza5_EC&dq=Laboratory+manual+for+chemical+analysis+of+cheese&hl=cs

- [29] MANNION, David T, Ambrose FUREY a Kieran N KILCAWLEY. Free fatty acids quantification in dairy products. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2016, **69**(1), 1-12 [cit. 2016-02-03]. DOI: 10.1111/1471-0307.12301. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1471-0307.12301>
- [30] RUIZ-GUTIÉRREZ, V a M.C PÉREZ-CAMINO. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, **885**(1-2), 321-341 [cit. 2016-02-08]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00181-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300001813>
- [31] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 202 s.
- [32] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravin*. 1. vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1991, 224 s.
- [33] CHRISTIE, W.W. *Gas Chromatography and Lipids* [online]. The Oily Press, 1989 [cit. 2016-02-04]. Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=39225>
- [34] ČSN EN ISO 12966-2. *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin: Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin*. 2015.
- [35] MCMURRY, John. *Organická chemie*. Vyd. 1. V Brně: VUTIUM, 2007, xxv, 1176, 61, 31 s. Str. 791-793.
- [36] LIU, Ke-Shun. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1994, **71**(11), 1179-1187 [cit. 2016-02-05]. DOI: 10.1007/BF02540534. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02540534>
- [37] KAIL, B. W., D. D. LINK a B. D. MORREALE Determination of Free Fatty Acids and Triglycerides by Gas Chromatography Using Selective Esterification Reactions. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2012, **50**(10), 934-939 [cit. 2016-02-05]. DOI: 10.1093/chromsci/bms093. Dostupné z: <http://chromsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/chromsci/bms093>
- [38] MARTIN-HERNÁNDEZ, M. C., L. ALONSO, M. JUÁREZ a J. FONTECHA Gas chromatographic method for determining free fatty acids in cheese. *Chromatographia* [online]. 1988, **25**(2), 87-90 [cit. 2016-02-08]. DOI: 10.1007/BF02259021. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02259021>
- [39] MINGMING, Mingming, Jingjing WANG a Qingshi TU. *UNIVERSITY OF CINCINNATI. Method of extracting lipids from trap grease with waste cooking oil. US20130239467 A1 Patent. Uděleno 2013-09-19. Dostupné také z: <http://www.google.com/patents/US20130239467>*
- [40] FOX, Patrick F., Paul L. H. MCSWEENEY a Patrick J FUQUAY. Encyclopedia of dairy sciences [online]. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2011 [cit. 2016-02-03]. ISBN 978-012-3744-074. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=dXE0ZfUnCKwC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [41] MCSWEENEY, Paul L. H. *Primary proteolysis of caseins in cheddar cheese* [online]. University College Cork, Ireland, 1993 [cit. 2016-02-03]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10468/1638>. Disertační práce. University College Cork.

- [42] IKINS, W.G., H.S. KWAK, Zink G.S. a Jeon I.J.. *The evaluation of rapid methods for monitoring free fatty acid levels in cheese* [online]. Kansas State University, Manhattan, KS: Kansas Agricultural Experiment Station, 1988 [cit. 2016-02-03]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/2097/14717>
- [43] SHIBAMOTO, Takayuki. *Lipid chromatographic analysis*. New York: Marcel Dekker, c1994, viii, 412 p. Dostupné také z: <https://books.google.cz/books?id=Wv5NAZev4vAC&printsec=frontcover&hl=cs>
- [44] KALUZYNY, M. A., L. A. DUNCAN, M. V. MERRITT a D. E. EPPS Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research* [online]. 1985, **26** [cit. 2016-02-05]. Dostupné z: <http://www.jlr.org/content/26/1/135.long>
- [45] EBELER, Susan E. a John D. EBELER SPE methodologies for the separation of lipids. *Inform* [online]. 1996, **7**(10) [cit. 2016-02-05]. Dostupné z: <http://aocs.files.cms-plus.com/inform/1996/10/1094.pdf>
- [46] RINCÓN, Arturo A., Verónica PINO, Juan H. AYALA a Ana M. AFONSO Multiple headspace solid-phase microextraction for quantifying volatile free fatty acids in cheeses. *Talanta* [online]. 2014, **129**, 183-190 [cit. 2016-02-03]. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.05.032. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914014004160>
- [47] PINHO, O., I. M. P. L. V. O. FERREIRA a M. A. FERREIRA Solid-Phase Microextraction in Combination with GC/MS for Quantification of the Major Volatile Free Fatty Acids in Ewe Cheese. *Analytical Chemistry* [online]. 2002, **74**(20), 5199-5204 [cit. 2016-02-03]. DOI: 10.1021/ac020296m. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac020296m>
- [48] TOMAINO, Ross M., James D. PARKER a Duane K. LARICK Analysis of Free Fatty Acids in Whey Products by Solid-Phase Microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, **49**(8), 3993-3998 [cit. 2016-02-03]. DOI: 10.1021/jf001503r. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf001503r>
- [49] WIJESUNDERA, C., L. DRURY a T. WALSH Determination of free fatty acids and lactones in cheese by solid phase microextraction. *Dairy Industry Association of Australia* [online]. 1998, **53**(2) [cit. 2016-02-09]. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/199495906?accountid=17115>
- [50] TUOMALA, Terhi a Heikki KALLIO. Identification of free fatty acids and some other volatile flavour compounds from Swiss cheese using on-line supercritical fluid extraction-gas chromatography. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* [online]. 1996, **203**(3), 236-240 [cit. 2016-02-03]. DOI: 10.1007/BF01192870. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01192870>
- [51] LARRÁYOZ, P, F.C IBÁÑEZ, A.I ORDÓÑEZ, P TORRE a Y BARCINA. Evaluation of supercritical fluid extraction as sample preparation method for the study of Roncal cheese aroma. *International Dairy Journal* [online]. 2000, **10**(11), 755-759 [cit. 2016-02-09]. DOI: 10.1016/S0958-6946(00)00109-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694600001096>
- [52] YEE, Jessica L., Hany KHALIL a Rafael JIMÉNEZ-FLORES. Flavor partition and fat reduction in cheese by supercritical fluid extraction: processing variables. *Le Lait* [online]. 2007, **87**(4-5), 269-285 [cit. 2016-02-09]. DOI: 10.1051/lait:2007020. Dostupné z: <http://www.lait-journal.org/10.1051/lait:2007020>
- [53] YEE, Jessica L., John WALKER, Hany KHALIL a Rafael JIMÉNEZ-FLORES. Effect of Variety and Maturation of Cheese on Supercritical Fluid Extraction Efficiency. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, **56**(13), 5153-5157 [cit. 2016-02-09]. DOI: 10.1021/jf703673n. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf703673n>
- [54] CAZES, Jack. *Encyclopedia of chromatography* [online]. New York: Marcel Dekker, c2001, xxx, 927 p. [cit. 2016-02-05]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=3Jeu8rMnbyEC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [55] ZHANG, Alex J. Why Automated Solid-Phase Extraction Is Superior to Traditional Extraction. *Thermo Scientific* [online]. Sunnyvale, CA, USA, 2013 [cit. 2016-02-05]. Dostupné z: http://www.dionex.com/en-us/webdocs/114353-WP-AutoTrace-SPE-Extractions-WP70622_E.pdf
- [56] HENNION, Marie-Claire. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **856**(1-2), 3-54 [cit. 2016-02-05]. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00832-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399008328>
- [57] POOLE, Colin F. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2003, **22**(6), 362-373 [cit. 2016-02-05]. DOI: 10.1016/S0165-9936(03)00605-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993603006058>
- [58] SÝKORA, Michal. *Optimalizace a validace metody stanovení volných mastných kyselin*. Brno, 2015. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [59] FONTANALS, N., R.M. MARCÉ a F. BORRULL New hydrophilic materials for solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2005, **24**(5), 394-406 [cit. 2016-02-05]. DOI: 10.1016/j.trac.2005.01.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993605000555>
- [60] WATERS CORPORATION. *Waters* [online]. 2016 [cit. 2016-02-05]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_CZ/SPE-Method-Development-Summary/nav.htm?locale=en_CZ&cid=10083883
- [61] FLURKEY, William H. Use of solid phase extraction in the biochemistry laboratory to separate different lipids. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. 2005, **33**(5), 357-360 [cit. 2016-02-03]. DOI: 10.1002/bmb.2005.49403305357. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmb.2005.49403305357>
- [62] HAMILTON, James G. a Karen COMAI. Separation of neutral lipid, free fatty acid and phospholipid classes by normal phase HPLC. *Lipids* [online]. 1988, **23**(12), 1150-1153 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1007/BF02535282. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02535282>
- [63] AGREN, J. J., A. JULKUNEN a I. PENTTILÄ Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column. *Journal Of Lipid Research* [online]. 1992, **33** [cit. 2016-02-06]. Dostupné z: <http://www.jlr.org/content/33/12/1871.full.pdf>
- [64] BATEMAN, H. Gale a Thomas C. JENKINS Method for Extraction and Separation by Solid Phase Extraction of Neutral Lipid, Free Fatty Acids, and Polar Lipid from Mixed Microbial Cultures †. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1997, **45**(1), 132-134 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1021/jf9603339. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9603339>
- [65] DE JONG, Catrienus a Herman T. BADINGS Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of High Resolution Chromatography*. 1990, **13**(2), 94-98. DOI: 10.1002/jhrc.1240130204. Dostupné také z:

<http://doi.wiley.com/10.1002/jhrc.1240130204>

- [66] ČSN EN ISO 1735 (57 1007). *Sýry a tavené sýrové výrobky: Stanovení obsahu tuku - Gravimetrická metoda (Referenční metoda)*. Praha: Český normalizační institut, 2005, s. 20.
- [67] Reversed-Phase SPE Methodology. *Sigma-Aldrich* [online]. 2016 [cit. 2016-03-21]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/reversedphase-methodology.html#tips>
- [68] POP, Zdeněk. *Použití tenkovrstvé chromatografie pro frakcionaci lipidů v sýrové matrici*. Brno, 2016. 45 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [69] PRUKNEROVÁ, K. *Stanovení mastných kyselin v tavených sýrech* Brno. Brno, 2014. Diplomová práce. Vysoké Učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [70] Náhrady normy (588767) ČSN ISO 5509 [kat: 17036]. *Technor* [online]. 2015 [cit. 2016-04-01]. Dostupné z: <http://www.technicke-normy-csn.cz/technicke-normy/17036-nahrady-588767-csn-iso-5509.html>
- [71] PERNET, Fabrice, Claude J. PELLETIER a Joyce MILLEY. Comparison of three solid-phase extraction methods for fatty acid analysis of lipid fractions in tissues of marine bivalves. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1137**(2), 127-137 [cit. 2016-04-05]. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.10.059. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306019431>
- [72] ČSN EN ISO 12966-2. *Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin: Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin*. 2015. Dostupné také z: http://eshop.normservis.cz/nahledy/view/csn/58/97173/97173_nahled.pdf

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMK – aminokyseliny
BMK – bakterie mléčného kvašení
DAG – diacylglyceroly
FA – mastné kyseliny
FFA – volné mastné kyseliny
FID – plamenově ionizační detektor
GC – plynová chromatografie
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS-SPME – headspace mikroextrakce tuhou fází
LLC – kapalinová rozdělovací chromatografie
LLE – extrakce kapalina-kapalina
LSC – kapalinová adsorpční chromatografie
MAG – monoacylglyceroly
MUFA – mononenasycené mastné kyseliny
PL – fosfolipidy
PUFA – polynenasycené mastné kyseliny
SFA – nasycené mastné kyseliny
SFE – superkritická fluidní extrakce
SPE – extrakce tuhou fází
SPME – mikroextrakce tuhou fází
TAG – triacylglyceroly
TLC – tenkovrstvá chromatografie
TMAH – tetramethylamonium hydroxid
UFA – nenasycené mastné kyseliny